

Methylharnsäuren in der Gattung Coffea

Vorkommen und metabolische Beziehungen zu Coffein
und Theobromin während der Pflanzenentwicklung
verschiedener Arten der liberio-excelsoiden Gruppe

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich

von JOSEF BRUNO PETERMANN
von Root LU

Begutachtet von den Herren
PD Dr. T. W. Baumann
und Prof. Dr. H. Wanner

Zürich 1981

Zentralstelle der Studentenschaft

1982

Methylharnsäuren in der Gattung Coffea

Vorkommen und metabolische Beziehungen zu Coffein
und Theobromin während der Pflanzenentwicklung
verschiedener Arten der liberio-excelsoiden Gruppe

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich

von JOSEF BRUNO PETERMANN
von Root LU

Begutachtet von den Herren
PD Dr. T. W. Baumann
und Prof. Dr. H. Wanner

Zürich 1981

Zentralstelle der Studentenschaft



INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	6
2.	Material und Methoden	13
2.1.	Pflanzenmaterial	13
2.2.	Analysenmethoden	14
2.2.1.	Extraktion	14
2.2.2.	Chromatographie und Quantifizierung	15
2.2.3.	Messung der Radioaktivität	16
2.3.	Synthese und Identifizierung der O(2)TMHS	17
2.4.	Synthese radioaktiver Tracer	20
2.4.1.	Synthese des 14C-Coffeins	20
2.4.2.	Synthese des 14C-Theobromins	20
2.4.3.	Synthese der 14C-TMHS und der 14C-O(2)TMHS	20
2.4.4.	Synthese der 14C-TrimHS	21
2.5.	Fütterung mit radioaktiven Tracern	22
3.	Resultate	24
3.1.	Entdeckung der O(2)TMHS	24
3.2.	Veränderung des Alkaloidmusters während der Blattentwicklung	24
3.3.	Analyse von Knospen und sehr jungen Blätter verschieden alter Pflanzen	28
3.4.	Verteilung des Alkaloidgehaltes und der metabolischen Aktivität im Blatt	31
3.5.	14C-Coffein-Fütterung	35
3.5.1.	Fütterung an mehreren Pflanzen der Spezies <i>C. abeokutae</i>	35
3.5.2.	Zeitversuche	37
3.6.	14C-TMHS-Fütterung	39
3.6.1.	Fütterung an verschiedenen Pflanzen der Spezies <i>C. liberica</i>	39
3.6.2.	Parallel-Fütterung von 14C-Theobromin und 14C-TMHS	40
3.7.	14C-Theobromin-Fütterung	44
3.7.1.	Fütterung an <i>C. liberica</i>	44
3.7.2.	Parallelfütterung von 14C-Theobromin und 14C-Coffein	46

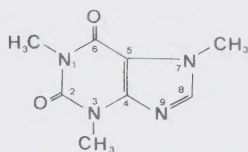
3.8.	14C-0(2)TriMHS-Fütterung	49
3.8.1.	Fütterung ringmarkierter, biosynthetischer 14C-0(2)TriMHS	49
3.8.2.	Fütterung methylmarkierter 14C-0(2)TriMHS	49
4.	Diskussion	51
4.1.	Das Alkaloidmuster	51
4.2.	Metabolismus der gefütterten Tracer	52
4.3.	Die Bedeutung der Methylharnsäuren für die Pflanze	56
5.	Zusammenfassung	57
6.	Literaturverzeichnis	59

ABKÜRZUNGEN

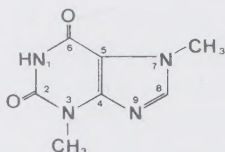
DiMHS	Dimethylharnsäure
MonoMHS	Monomethylharnsäure
TMHS	1,3,7,9-Tetramethylharnsäure
O(2)TMHS	O(2),1,7,9-Tetramethylharnsäure
O(8)TMHS	O(8),1,3,7-Tetramethylharnsäure
O(2)TriMHS	O(2),1,9-Trimethylharnsäure
DC	Dünnschichtchromatographie
HPLC	Hochauflösende Flüssigchromatographie
LBP	Laubblattpaar
LM	Laufmittel
s.A.	spezifische Aktivität
TG	Trockengewicht

1. EINLEITUNG

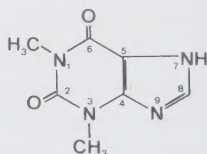
Die methylierten Xanthine Coffein, Theobromin und Theophyllin waren schon längst bekannt, als die erste Methylharnsäure aus einer Pflanze isoliert wurde. Der Grund liegt wohl darin, dass die Methylxanthine, die zusammen mit den Methylharnsäuren zu den Purinalkaloiden gehören, in den Genussmitteln Kaffee, Kakao und Tee vorkommen, die schon früh in Europa verbreitet waren. Coffein wurde erstmals von Runge (1820) aus Kaffeebohnen isoliert. 22 Jahre später entdeckte Woskresensky (1842) in Kakaobohnen das Theobromin, als er Coffein isolieren wollte, und 1888 "constatirte" Kossel in Teextrakt "eine neue Base, welche in geringeren Mengen neben dem Coffein auftritt", für die er den Namen Theophyllin vorschlug. Die Strukturaufklärung und Synthese dieser drei Methylxanthine gelang dem deutschen Chemiker Fischer gegen Ende des letzten Jahrhunderts (Fischer und Ach, 1895; Fischer, 1897).



1,3,7-Trimethylxanthin
(Coffein)

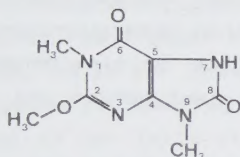


3,7-Dimethylxanthin
(Theobromin)

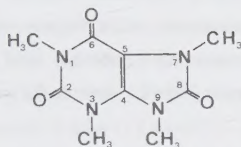


1,3-Dimethylxanthin
(Theophyllin)

Im Jahre 1937 fand Johnson im Rückstand von kommerziellen Coffeinextraktionen "aus mehreren Millionen Pfund Tee" Kristalle, die er als 1,3,7,9-Tetramethylharnsäure (TMHS) identifizierte. 1975 isolierten Wanner et al. an unserem Institut dieselbe Harnsäure, sowie die bisher in der Natur unbekannte O(2),1,9-Trimethylharnsäure (O(2)TriMHS) aus jungen Blättern von *Coffea liberica*, *C. arnoldiana*, *C. dewevrei* var. *excelsa* und var. *aruwimiensis*. Die TMHS war bereits 1884 von Fischer, die O(2)TriMHS zu Beginn dieses Jahrhunderts von Biltz und seinen Mitarbeitern synthetisiert worden (Fischer, 1884; Biltz und Pardon, 1932).



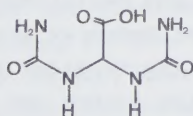
O(2),1,9-Trimethylharnsäure



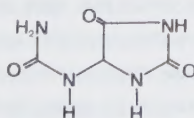
1,3,7,9-Tetramethylharnsäure

Obwohl es sich bei den bisher erwähnten Verbindungen der Natur nach um Purinderivate handelt, müssen sie dem Sekundärstoffwechsel zugeordnet werden, denn ihre Verbreitung im Pflanzenreich ist beschränkt. Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese Substanzen in weiteren Pflanzengruppen vorkommen, die bisher ungenügend oder überhaupt nicht untersucht worden sind. Die stoffwechselphysiologische und ökologische Bedeutung dieser Pflanzenstoffe ist noch weitgehend unbekannt. Da der Sekundärstoffwechsel für die höhere Pflanze aber geradezu ein Charakteristikum ist, müssen wir annehmen, dass er für die Pflanze keineswegs bedeutungslos ist.

Zum Stoffwechsel der Methylxanthine und der verwandten stickstoffhaltigen Verbindungen Allantoin und Allantoinsäure liegen einige Untersuchungen vor, die es uns erlauben - zusammen mit der vorliegenden Arbeit über die Methylharnsäuren -, die Bedeutung dieser Stoffe in einem grösseren Zusammenhang zu diskutieren.



Allantoinsäure



Allantoin

Weevers (1930) betrachtete die "Xanthinbasen" als eine "ökonomische Form der Stickstoffspeicherung" und das Coffein in den Kaffeebohnen als Reservestoff. In seinen Untersuchungen an Coffea, Theobroma, Cola und Camellia stellte er eine Abnahme der Xanthinbasen fest, wenn Eiweisse synthetisiert wurden und umgekehrt.

Mothes und Engelbrecht (1952) untersuchten die Rolle des Allantoins und der Allantoinsäure in der Gattung Acer (Ahorn). Dort werden diese Ureide gespeichert, und ihr Anteil am löslichen Stickstoff beträgt z.B. im Blutungssaft der Wurzel bis zu 100 %, in jungen Achseltrieben bis zu 36 %. Die Autoren weisen auf die viel engere Beziehung der Ureide zum Proteinstoffwechsel als zum Purinstoffwechsel hin und bezeichnen sie als "Wanderform des Stickstoffs" und "reaktives Amin". Eine Untersuchung von Reinbothe (1961) zeigte jedoch, dass die Biosynthese der erwähnten Ureide in den sogenannten "Allantoinpflanzen" über den Purinabbau erfolgen muss. Diese Resultate wurden in neuester Zeit durch Untersuchungen an der Buschbohne (*Phaseolus vulgaris*) bestätigt (Thomas et al., 1980). Die Resultate der Versuche zur Biosynthese der Ureide mit Hilfe des Xanthinoxidase-Inhibitors Allopurinol weisen darauf hin, dass Allantoin und Allantoinsäure aus dem Abbau von Purinkörpern entstehen. Andere Synthesewege, z.B. durch Kondensation von Harnstoff und Glyoxylsäure konnten jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Neben dem erwähnten, ökonomischen Aspekt betonte Mothes (1965) die Rolle der stickstoffhaltigen Speichersubstanzen in Pflanzen bei der Ammoniakentgiftung. Im Stoffwechsel fällt unter anderem Ammoniak als Produkt des steten Protein- und Nukleinsäureabbaus an. Im Gegensatz zur Pflanze kann das Tier Ammoniak aber nur beschränkt zur Proteinsynthese verwenden. Es scheidet ihn deshalb direkt aus oder setzt ihn, wie dies öfters der Fall ist, zuerst in Harnsäure oder Harnstoff um. Pflanzen hingegen besitzen keinen derartigen Ausscheidungsmechanismus, darum muss Ammoniak entgiftet und in eine günstige Speicherform gebracht werden, aus welcher der Stickstoff für eventuell spätere Syntheseleistungen wieder verfügbar ist. Die tierischen Exkrete Harnstoff und Harnsäure wurden bei der Pflanze nur in geringen Konzentrationen gefunden. Harnstoff scheint sich als

"metabolisches Exkret" (Mothes, 1966) nicht zu eignen, denn ein kleinmolekularer, osmotisch aktiver Stoff müsste dauernd unter Energieaufwand gegen ein Konzentrationsgefälle transportiert werden, um in der Zelle gespeichert zu werden. Die unmethylierte Harnsäure ist sehr schlecht löslich, und der Stickstoff wäre, einmal in der Zelle als Harnsäure auskristallisiert, nicht mehr verfügbar. Ebenso verhält es sich mit dem Xanthin.

Hingegen gelten einige Aminosäuren, die von verschiedenen Pflanzengruppen akkumuliert werden, als typische Exkrete. Auch Allantoin und Allantoinsäure besitzen neben der bereits erwähnten Aufgabe der Stickstoffspeicherung Exkretcharakter. Um die Rolle der uns interessierenden Methylxanthine und -harnsäuren abzuklären, bedarf es stoffwechselphysiologischer Untersuchungen, wobei der Abbau der genannten Stoffe im Vordergrund stehen muss. Ueber Abbauprodukte des Coffeins in der Pflanze liegt lediglich die Arbeit von Kalberer (1964) vor. Im Säugerorganismus ist das Schicksal des eingenommenen Coffeins ziemlich gut bekannt, und ich möchte zuerst einige Resultate aus diesen Arbeiten erwähnen, denn ihre Kenntnis hilft, die Vorgänge im pflanzlichen Coffeinstoffwechsel, der im Anschluss diskutiert wird, besser zu verstehen.

Die oft mit Tee- und Kaffeegenuss verbundenen physiologischen Effekte, wie Schlaflosigkeit, Stimulation der Harnausscheidung u.s.w., konnten sehr schnell auf die Wirkung des Coffeins zurückgeführt werden. Deshalb war man schon früh an dessen Schicksal im menschlichen Körper interessiert. Bereits Mitte des letzten Jahrhunderts berichtete Lehmann (1850), zitiert von Myers (1928), in seinem Lehrbuch der physiologischen Chemie, dass nach der Einnahme von Coffein keine entsprechende Ausscheidung im Urin erfolgt. Spätere Experimente verschiedener Forscher zeigen, dass nur ein Bruchteil des aufgenommenen Coffeins im Urin unverändert wieder ausgeschieden wird. Nachdem man Paraxanthin (1,7-Dimethylxanthin) und Monomethylxanthine aus menschlichem Urin isoliert hatte, wurden auch diese Verbindungen in die Untersuchungen zum Coffeinabbau einbezogen. Fast gleichzeitig fanden Albanese (1895) sowie Bodzynski und Gottlieb (1895) im Urin des Hundes und Kaninchens eine erhöhte Ausscheidung von Monomethylxanthinen nach Fütterung der Tiere mit Coffein. Experimente mit Theophyllin und Theobromin ergaben

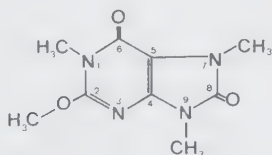
ähnliche Resultate. Nach der Entwicklung von kolorimetrischen Nachweismethoden (Benedict, 1916) gelang es eindeutig, beim Mensch eine Erhöhung der Harnsäureausscheidung nach Coffeineinnahme nachzuweisen. Theophyllin hat im Gegensatz zu Theobromin denselben Effekt. Ob es sich um eine alkylierte Harnsäure handelt oder nicht, vermochten die Autoren aufgrund ihrer Nachweismethode jedoch nicht zu beurteilen.

Mit der Aufnahme von Coffein, Theobromin und Theophyllin in pharmazeutische Präparate folgten sich immer mehr Untersuchungen über den Katabolismus der Methylxanthine in Mikroorganismen, verschiedenen Säugern und im Mensch. Neueste Tracerstudien an Ratten (Arnaud, 1976, 1979) zeigen für Coffein einen Abbaueweg über das 4-Amino-5-(N-methylformylamino)-1,3-dimethyluracil und verschiedene Nebenwege über die Dimethylxanthine, sowie über die entsprechenden Methylharnsäuren zu Methylallantoin und Methylharnstoff. Für Theobromin erfolgt der Abbaueweg offenbar analog über das Monomethyluracil. Auch hier führen Nebenwege über die Monomethylxanthine zu den entsprechenden Monomethylharnsäuren. Alle diese Abbauewege dürften aufgrund von Harnanalysen auch für den Mensch Gültigkeit haben.

Wie bereits erwähnt, besteht bisher zum Coffeinabbau in der Pflanze nur die Arbeit von Kalberer (1964), in welcher der Weg und die Produkte des Abbaus mit Hilfe radioaktiv markierter Tracer untersucht wurden. Nach der Fütterung von sowohl ring- als auch methylmarkiertem Coffein produziert das alternde Blatt von *C. arabica* radioaktives CO₂, ein Beweis, dass das Molekül ganz abgebaut werden kann. In Versuchen mit ringmarkiertem Coffein erscheint die Radioaktivität vor allem im Allantoin, aber auch Allantoinsäure, Harnstoff und wahrscheinlich das 3-Methylxanthin und/oder das 7-Methylxanthin, sowie drei unbekannte Verbindungen sind radioaktiv markiert. Es gelang aber nicht, diese mit den folgenden Harnsäuren zu identifizieren: 1-MonoMHS, 3-MonoMHS, 7-MonoMHS, 1,7-DiMHS, 3,7-DiMHS, und 1,3,7-TriMHS. Bei den Versuchen mit methylmarkiertem Coffein trat zu den drei unbekannten Verbindungen noch eine vierte hinzu. Offenbar handelt es sich auch nicht um Aminosäuren. Getestet wurden: Methionin, Citrullin, Arginin, und Serin. Kalberer kommt zum Schluss, dass der Pyrimidinring des Coffeins vor der Oxidation zu Methylharnsäure oder vor der Demethylierung geöffnet wird,

und die unbekannten Substanzen Ureide sein müssen.

Bei der Isolation von TMHS und O(2)TriMHS aus *C. liberica* (Wanner et al., 1974) wurde bemerkt, dass das Auftreten dieser Harnsäuren und des Coffeins an bestimmte vegetative Entwicklungsstadien gebunden war. Eine Studie über diese Beobachtung zeigte, dass junge Pflanzen von *C. liberica* ausschliesslich Coffein enthalten, welches allmählich durch TMHS ersetzt wird. Noch vor Beginn der Verzweigung wird diese aber von der O(2)TriMHS zumindest teilweise verdrängt (Baumann et al., 1976). Dabei tritt eine weitere Substanz in kleinen Konzentrationen hinzu, welche im Rahmen dieser Arbeit als O(2),1,7,9-Tetramethylharnsäure (O(2)TMHS) identifiziert werden konnte.



O(2),1,7,9-Tetramethylharnsäure

Während die jungen Blätter vieljähriger Bäume in diesem Methylharnsäure-Stadium bleiben, bilden sich Früchte aus, deren Samen während des Wachstums, d.h. mit Beginn der Endospermentwicklung zum "Xanthinprinzip" zurückkehren. Das Perikarp der reifen Frucht enthält noch beachtliche Mengen Methylharnsäuren, während diese in den Bohnen neben einem Gehalt von 1-2 % Coffein mengenmässig zurücktreten (Citroreksoko, 1979). Zur Klärung des metabolischen Zusammenhangs zwischen den Methylharnsäuren wurden in derselben Arbeit junge Früchte mit radioaktiv markierten Methylharnsäuren gefüttert. Die ¹⁴C-TMHS wurde im jungen Perikarp von *C. excelsa* zu O(2)TriMHS und mehreren unbekannten Substanzen metabolisiert, während sie im Perisperm unverändert liegen blieb. Bei *C. abeokutae* erfolgte die Umsetzung zu O(2)TriMHS weder im Perikarp noch im Perisperm. Es wurden nur die oben erwähnten, unbekannten Verbindungen markiert. Die Fütterung des Perikarps mit markierter O(2)TMHS

ergab folgendes Ergebnis: Bei *C. excelsa* konnte die Radioaktivität ausser in der TMHS und einigen unbekannten Verbindungen, vor allem in der O(2)TriMHS gefunden werden. Bei *C. abeokutae* wurde praktisch nur die O(2)TriMHS markiert. Aufgabe dieser Arbeit war es, den oben beschriebenen Uebergang von der coffein- zur methylharnsäurehaltigen Pflanze, wie er in der vegetativen Entwicklung der liberio-excelsoiden Kaffeearten beobachtet werden kann, genauer zu verfolgen. Im besonderen ging es darum, die jeweils vorhandenen metabolischen Aktivitäten des Purinalkaloid-Stoffwechsels durch Fütterung geeigneter Tracerverbindungen zu bestimmen. Damit soll ein Beitrag geleistet werden zur Klärung der Frage nach der Bedeutung der Purinalkaloide für die Pflanze.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. PFLANZENMATERIAL

Alle Versuche wurden mit grossblättrigen Kaffeepflanzen durchgeführt, die unter den Sammelbegriff "Liberio-excelsoide" (Charrier und Berthaud, 1975) fallen. Da die einzelnen Arten, bzw. Varietäten nicht leicht unterscheidbar sind, habe ich mich an die Bezeichnung gehalten, unter der wir das Samenmaterial jeweils erhalten haben.

Bei *C. dewevrei* De Wild. et Durand var. *excelsa* handelt es sich um Pflanzen der zweiten Generation aus unserem Gewächshaus. Die Samen stammen aus dem Botanischen Garten von Bogor, Indonesien. Die *Coffea liberica* Pflanzen kommen aus zwei verschiedenen Quellen: Die einen erhielten wir wiederum vom Botanischen Garten in Bogor, die andern vom "Institut Français du café, du cacao et autres plantes stimulantes" (IFCC) bei Man (Elfenbeinküste).

Die Bohnen von *C. abeokutae* wurden von drei Bäumen der Kollektion des IFCC in Divo (ebenfalls Elfenbeinküste) geerntet. Alle Pflanzen wurden in unserem Versuchsgewächshaus aufgezogen. Die Temperatur lag im Mittel zwischen 22 und 25°C. Die relative Luftfeuchte schwankte zwischen 50 und 70 %.

Zudem bestand die Möglichkeit, für ausgewählte Versuche, in welchen ein konstantes, den natürlichen Bedingungen entsprechendes Klima benötigt wurde (Versuche in den Kapiteln 3.2. und 3.4.), die Pflanzen in der Klimakammer (Weiss) zu kultivieren.

Bedingungen:	Tag	Temperatur 29°C	rel. Feuchte 82 %
	Nacht	22°C	90 %
	Licht (12 h)	120-150 W/m ²	

2.2. ANALYSENMETHODEN

2.2.1. EXTRAKTION

Die Extraktionsmethode wurde im Verlaufe der Arbeit mehrmals geändert, um sie an die jeweilige Extraktions-Aufgabe anzupassen und dank neuen Techniken zu verbessern.

a) Die Magnesiumoxid-Methode

Das getrocknete (80°C, Gewichtskonstanz) Blattmaterial wurde im Mörser zerrieben und während 20 min in 0.0125 N Schwefelsäure gekocht. Nach Zugabe von schwerem Magnesiumoxid wurde nochmal 15 min erhitzt (100 ml Säure und 13 g MgO / g Blattmaterial (TG)). Der Extrakt wurde noch warm durch einen G4 Glasfilter filtriert und der Rückstand mit wenig Wasser gespült. Das Filtrat wurde 3mal mit Chloroform ausgeschüttelt, und die vereinigten Chloroformphasen wurden am Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht (300 ml Chloroform / g Blattmaterial). Bei dieser Methode beträgt der Verlust an Theobromin ungefähr 80 %, derjenige an Coffein und Methylharnsäuren weniger als 5 % .

b) Die Extrelut-Methode

Das trockene und nur wenig zerkleinerte Blattmaterial wurde, wie unter a) beschrieben, 20 min in Schwefelsäure gekocht und nach Abkühlen auf eine Extrelutsäule (Merck) gebracht (ca 0.7 g Extrelut / ml wässrige Phase). Nach 10 min wurde mit der 4-5fachen Menge Chloroform eluiert und das Elutionsmittel abrotiert. Bei dieser Methode liegt auch der Verlust an Theobromin unter 5 % .

c) Die Bariumhydroxid-Methode

Trocknen und Kochen erfolgte wie bereits beschrieben. Der saure Extrakt wurde aber mit einer gesättigten Ba(OH)₂-Lösung neutralisiert (pH 7), und der sich bildende Niederschlag aus Bariumsulfat sowie das Pflanzenmaterial abzentrifugiert. Der klare Ueberstand wurde am Rotationsverdampfer auf ca 1/2 ml eingeeengt.

d) Die Sep-Pak-Methode

Das getrocknete und zerkleinerte Blattmaterial wurde während einer Stunde im Methanol gerührt (200 ml MeOH / g TG). Anschliessend wurde der Extrakt mit Wasser auf 70 % (MeOH) verdünnt und mit einer Sep-Pak-Kartusche (Waters), die vorher mit Wasser konditioniert worden war, filtriert. Dadurch wurden stark hydrophile Stoffe im Filter adsorbiert. Das Eluat wurde am Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht.

2.2.2. CHROMATOGRAPHIE UND QUANTIFIZIERUNG

Die Auftrennung methylierter Harnsäuren und Xanthine erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (DC) oder hochauflösender Flüssigchromatographie (HPLC).

a) Dünnschichtchromatographie (DC)

Der trockene Rohextrakt wurde in Chloroform aufgenommen und ein Aliquot auf das Chromatogramm (DC-Alufolien, Kieselgel 60 F 254, Merck) aufgetragen. Bei der Extraktionsmethode c) wird direkt der wässrige Extrakt aufgetragen. Zur Verifikation dienten auf demselben Chromatogramm aufgetragene Referenzsubstanzen. Es wurde nacheinander in zwei Laufmittelsystemen entwickelt:

LM1: Chloroform/Methanol 95/5

LM2: Aethylacetat/Wasser/Ameisensäure 60/35/5 (obere Phase), (Fink und Adams, 1966)

Nach der Entwicklung im ersten Laufmittelsystem wurden die Substanzen im UV (254 nm) lokalisiert, und die Platte wurde zwischen TMHS und O(2)TrimHS entzweigeschnitten. Der obere Teil des Chromatogrammes wurde dann im zweiten Laufmittel entwickelt, damit sich auch Coffein und TMHS vollständig voneinander trennten. Die Rf-Werte nach der 2. Chromatographie betrugen für:

Theobromin	0.15	Coffein	0.58
O(2)TrimHS	0.24	O(2)TMHS	0.72
TMHS	0.53		

Zur Quantifizierung wurden die entsprechenden Zonen ausgeschnitten, in Methanol eluiert und spektrophotometrisch gemessen (Beckman DB). Die Berechnung erfolgte auf Grund der molaren Extinktionskoeffizienten beim ersten Absorptionsmaximum:

Theobromin	271 nm	10230
O(2)TriMHS	282 nm	8155
TMHS	292.5 nm	9965
Coffein	271 nm	10470
O(2)TMHS	284.5 nm	8145

b) Hochauflösende Flüssigchromatographie (HPLC)

Die mit der Extrelut-Methode aufgearbeiteten Proben wurden in Wasser gelöst, mit 100 µg internem Standard (Phenacetin) versetzt und an einem Flüssigchromatographen (Waters Ass.) unter folgenden Bedingungen aufgetrennt.

Säule	µBondapak C18 (Waters)
Detektor	UV 271 nm
mob. Phase	Wasser / Methanol 75/25
Fluss	3 ml pro min

Die k' -Werte betrugen für:

Theobromin	1.40	O(2)TriMHS	6.27
TMHS	2.72	O(2)TMHS	13.16
Coffein	4.98	Phenacetin	16.04 (int.Std.)

Die Quantifizierung erfolgte durch Integration der UV-Absorption.

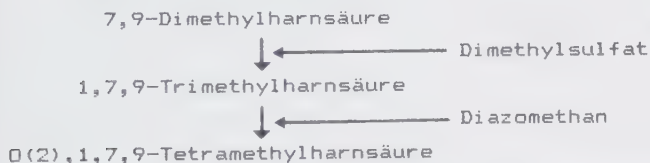
2.2.3. MESSUNG DER RADIOAKTIVITÄT

Der radioaktive Extrakt wurde dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und die Verteilung der Radioaktivität mit einem DC-Scanner (Berthold) bestimmt. Die Zonen mit radioaktiven Verbindungen wurden ausgeschnitten, in 1 ml Methanol eluiert, die Eluate mit 10 ml Zählösung Luma Gel (Lumac) vermischt und im Szintillationszähler (Nuclear-Chicago) gemessen. Die Berechnung der Zerfälle erfolgte über das Kanalverhältnis.

2.3. SYNTHESE UND IDENTIFIZIERUNG DER O(2)TMHS

a) Synthese

Um die in der Einleitung erwähnte Substanz, die meistens in jungen Blättern baumgrosser Pflanzen von *C. liberica* in Spuren neben der O(2)TriMHS auftritt, zu identifizieren, musste ihre vermutliche Struktur bestätigt werden. Dazu war es einerseits nötig, sie in genügend grosser Menge aus den Pflanzen zu isolieren, anderseits, sie chemisch zu synthetisieren. Die chemische Synthese erfolgte durch Methylierung der käuflichen 7,9-Dimethylharnsäure:



1 g 7,9-DiMHS (Fluka) und 1.7 g Kaliumhydroxid wurden in 25 ml Wasser gelöst und mit 1.7 ml Dimethylsulfat versetzt (verkleinert nach Biltz und Bülow, 1921). Die Umsetzung zeigte sich durch einen Temperaturanstieg auf 26°C an. Nach Ansäuern mit HCl (pH 6) wurde das Wasser bei Unterdruck verdampft. Der Rückstand wurde 3mal mit 66 ml Aethanol unter Rückfluss während 2 h ausgekocht. Die Auszüge wurden zur Trockne gebracht und das Rohprodukt in Wasser auskristallisiert. Es bildete sich ein flockiges, amorphes Kristallisationsprodukt. Das trockene (70°C) und fein zerriebene Kristallinat wurde mit ätherischem Diazomethan (Werner, 1919) versetzt (Biltz und Max, 1920). Die Methylierungsreaktion konnte anhand der Stickstoffentwicklung verfolgt werden. Nach Verdampfen des Aethers wurde das Umsetzungsprodukt chromatographisch (DC) aufgetrennt. Die Ausbeute an O(2)TMHS betrug 35 % der eingesetzten 7,9-DiMHS. Nach Eluieren in Methanol und erneuter Chromatographie kristallisierten aus Wasser kleine, weisse Nadeln aus, die sich filzartig zusammenlagerten.

b) Identifizierung

Die synthetisch gewonnene O(2)TMHS wurde mit der aus Pflanzen chromatographisch (DC) isolierten Substanz in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften verglichen.

Chromatographie

Ein Gemisch der synthetisierten und der isolierten Substanz konnte chromatographisch nicht mehr aufgetrennt werden. Es wurden 3 Systeme verwendet:

1. LM1
2. LM2
3. Aceton/Benzol 7/3, Kammersättigung mit Ammoniak (Stahl, 1967)

UV-Spektroskopie

Das Absorptionsspektrum der beiden Proben ist identisch:

Maxima	284	246	209 nm
Minima		263	225 nm

IR-Spektroskopie

Bis auf eine Absorptionsbande bei der Wellenzahl 3400 pro cm, die dem Wasser zugeschrieben werden muss, sind die beiden Spektren identisch.

Massenspektroskopie *

Die folgende Tabelle zeigt, dass die Masse der einzelnen Peaks bei beiden Proben in sehr ähnlicher Intensität auftritt. Die Peaks sind entsprechend des Verhältnisses Masse/Ladung (m/e-Wert) aufgeführt, und ihre relative Intensität ist in Bezug auf den Massenpeak (M+ = 100 %) berechnet:

Masse (m/e)	Relative Intensität (%)	
	isoliert	synthetisiert
224 (M+)	100	100
209	9.4	10
195	7.3	6.6
181	20.4	18.5
168	6.0	5.3
167	7.3	6.6
166	11.4	10.3
139	7.4	6.8
124	8.5	7.6
83	38	35
82	11	9.8
72	6.4	5.8
67	8.7	8.0

Pyrolyse *

Beide Proben ergaben beim Erhitzen TMHS. Die Verifizierung erfolgte chromatographisch (DC).

Schmelzpunkt *

202°C isolierte Substanz
205°C synthetische O(2)TMUA

Der niedrigere Schmelzpunkt nach Biltz und Max (186-197°C) dürfte von Verunreinigungen herrühren.

* Die Aufnahme des Massenspektrums, Pyrolyse und Schmelzpunktbestimmung wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Hesse und Herrn Guggisberg (Organisch-chemisches Institut der Universität Zürich) durchgeführt.

2.4. SYNTHESE RADIOAKTIV MARKIERTER TRACER

2.4.1. 14C-COFFEIN

Die Synthese des radioaktiv markierten Coffeins erfolgte durch Methylierung von 2-14C-Xanthin mit Dimethylsulfat (Heftmann, 1971): 50 μ Ci 2-14C-Xanthin (Commissariat de l'Energie Atomique, Paris) wurden in 50 ml 0.25 N NaOH gelöst und davon 25 ml, zusammen mit 15 ml Wasser und 2 ml Dimethylsulfat, in einem Reaktionsgefäß gerührt. Durch portionenweise Zugabe von NaOH wurde das pH konstant bei 9 gehalten (pH-Stat E 473, Metrohm). Nach Beendigung der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch mit HCl angesäuert (pH 4), 4mal mit je 50 ml Chloroform ausgeschüttelt und die stark eingeeengte Chloroformphase mit DC aufgetrennt (LM: Chloroform/Methanol 4/1). Die radiochemischen Verunreinigungen betrugen weniger als 2 %. Die Zone mit 14C-Coffein wurde eluiert, und nach einer weiteren chromatographischen Reinigung (LM2, siehe unter 2.2.2.) wurde der Tracer in den Pflanzenversuchen eingesetzt.

2.4.2. 14C-THEOBROMIN

Zur Synthese von markiertem Theobromin wurden 80 μ Ci 2-14C-Xanthin in 10 ml Puffer (0.05 M Borsäure mit 0.05 M KCl, pH 9) gelöst und 4mal mit je 20 μ l Dimethylsulfat versetzt (Frischknecht und Baumann, 1979). Durch Zugabe von KOH wurde das pH wiederum beibehalten (pH-Stat). Das Reaktionsgemisch wurde auf einer Extrelutsäule von den Salzen befreit und die eluierte und eingeeengte Chloroformphase gemäss der zitierten Literatur chromatographiert.

2.4.3. 14C-TMHS UND 14C-O(2)TMHS

Die Darstellung dieser Tracer erfolgte durch Methylierung von 2-14C-Harnsäure (The Radiochemical Center, Amersham) mit Dimethylsulfat (Citroreksoko et al., 1980). 10 μ Ci dieser Harnsäure (spez. Akt: 51mCi/mmol) wurden in 10 ml Wasser gelöst und mit 2 ml Dimethylsulfat versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde dauernd gerührt und das pH durch portionenweise Zugabe von 2 N

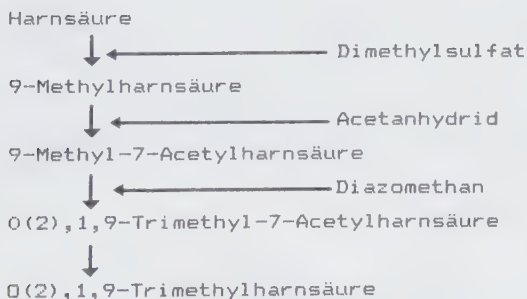
NaOH (pH-Stat) konstant bei 9 gehalten. Nach Beendigung der Reaktion (ca 22 h) wurde die Lösung mit HCl auf pH 4 angesäuert und 4mal mit je 10 ml Chloroform extrahiert. Nach Einengen erfolgte eine erste Chromatographie im LM1. Die 3 Hauptprodukte (Bestimmung mit dem DC-Radioscanner) wurden eluiert und in Aceton/Benzol 7/3 (Kammer ammoniakgesättigt) rechromatographiert. Die Radioaktivität war wie folgt verteilt (Aktivität der eingesetzten Harnsäure = 100 %):

	Radioaktivität	Rf-Wert
TMHS	44 %	0.43
O(2)TMHS	4 %	0.52
O(8)1,3,7-TMHS	6 %	0.60

Als weitere Reaktionsprodukte traten mindestens 4 zusätzliche, nicht identifizierte Verbindungen mit total 8 % Aktivität auf.

2.4.4. ^{14}C -O(2)TRIMHS

Es wurde versucht, ringmarkierte O(2)TriMHS über folgenden, von Biltz und Pardon (1932) beschriebenen Syntheseweg darzustellen:



Es gelang aber nicht, die Synthese mit derart geringen Substanzmengen durchzuführen, wie dies mit der käuflichen 2- ^{14}C -Harnsäure als Edukt nötig gewesen wäre.

Aus diesem Grunde wurde ^{14}C -O(2)TriMHS synthetisiert, bei der die Methoxylgruppe des C an Stellung 2 den radioaktiven Kohlenstoff trägt.

Acetylierung der 1,9-Dimethylharnsäure

Es wurden 50 mg 1,9-DiMHS (Fluka) in 25 ml Acetanhydrid während 2 h unter Rückfluss gekocht. Nach Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das zurückbleibende Reaktionsprodukt aus wenig Acetanhydrid auskristallisiert, im Vakuum getrocknet und über di-Phosphorpentoxid aufbewahrt (Biltz und Pardon, 1932).

Synthese des 14C-Diazomethans (Werner, 1919)

Vom Ausgangsprodukt, N-Methyl-14C-N-Nitrosomethylharnstoff (NEN, Boston, s.A: 16.7 mCi/mMol), gelöst in Methylenchlorid, wurden 125 µl in ein kleines Reaktionsgefäß (3 ml) mit Septum pipettiert und durch Abdampfen vom Lösungsmittel befreit. Nach Zugabe von Wasser wurde mit Aether überschichtet (je 0.5 ml). Die Freisetzung des Diazomethans geschah durch Injektion von 250 µl 10 N KOH. Nachher wurde die wässrige Phase mit einer Spritze abgezogen und die verbleibende Aetherphase mit wenig festem KOH getrocknet.

Methylierung der 1,9-Dimethyl-7-Acetylharnsäure

Sie wurde in fester Form (1.8 mg) zur Diazomethanlösung gegeben und das Reaktionsgemisch (nach 1 h) dünnschichtchromatographisch (erst kurz in Aethanol mit 1 % HCl conc., dann in LM1) aufgetrennt. Die Lokalisierung der Radioaktivität geschah mit dem DC-Scanner. Neben O(2)TriMHS traten mindestens 4 weitere Reaktionsprodukte auf. Die 14C-O(2)TriMHS wurde mit Methanol eluiert und im LM2 rechromatographiert. Die radiochemische Reinheit lag über 99 % . Die Ausbeute (1.7 Mio dpm) betrug 0.6 % der eingesetzten Radioaktivität.

2.5. FÜETTERUNG MIT RADIOAKTIVEN TRACERN

Infiltration von Blattscheiben

Die Blattscheiben wurden mit einem Korkbohrer (Durchmesser 1.0 cm) ausgestanzt und in ein rundes Gefäß (Innendurchmesser 1.1 cm) gebracht, worin sich der in Wasser gelöste Tracer befand. Damit die Blattscheiben ganz in die Lösung eintauchten, wurden

sie mit einer kleinen Glaskugel beschwert. Um die Luft aus dem interzellulären Raum durch die Tracerlösung zu ersetzen, wurde das Fütterungsgefäß mit den Blattscheiben in einen Exsikkator gestellt und dieser an einer Wasserstrahlpumpe angeschlossen. Sobald der Druck auf ca 200 mbar gesunken war, wurde der Exsikkator wieder belüftet, die Blattscheiben wurden aus der Fütterungslösung genommen und mit Filterpapier abgetrocknet. Nachdem das Wasser aus den Interzellularen verdunstet war, wurden die Blattscheiben für die Dauer des Experimentes in eine grosse Petrischale gelegt, deren Wände und Boden mit einem nassen Filterpapier ausgekleidet waren, um das Austrocknen der Blattscheiben zu verzögern. Sie wurden mit einer Fluoreszenzlampe (40 W) im Abstand von 30 cm beleuchtet. Die Temperatur betrug 26°C. Zur Berechnung der aufgenommenen Radioaktivität wurde von der eingesetzten Menge Tracer die Radioaktivität am Filterpapier und im Fütterungsgefäß abgezogen.

Infiltration ganzer Blätter

Mit Hilfe der Vorrichtung von Hagborg (1970) wurde der Interzellularraum des Blattes durch die Spaltöffnungen der Unterseite mit der gewünschten Tracerlösung gefüllt. Aus technischen Gründen (Applikationsverluste) konnte die Menge des infiltrierten Tracers nur annähernd berechnet werden. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass das Experiment an der intakten Pflanze und ohne Beschädigung des Blattes ausgeführt werden kann.

3. RESULTATE

3.1. ENTDECKUNG DER O(2),1,7,9-TMHS

Nach dem Vergleich der physikalisch-chemischen Eigenschaften der synthetischen O(2)TMHS mit der aus *C. liberica* isolierten, bisher unbekannten Substanz ist ihre Identität und ihr Vorkommen in grossblättrigen Kaffeearten gesichert. Damit konnte auch diese Methylharnsäure in die Untersuchungen über die Veränderung des Alkaloidmusters und in die Tracerversuche grossblättriger *Coffea* Arten einbezogen werden.

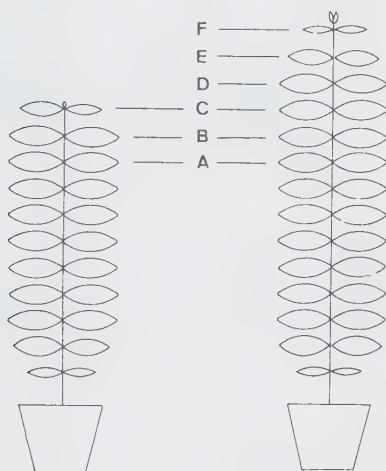
Die O(2)TMHS tritt in den untersuchten *Coffea* Arten *liberica* und *aruwimiensis* frühestens zur Zeit der 1. Verzweigungen als Begleitsubstanz der O(2)TriMHS auf. Sie ist aber vor allem in den jungen Blättern alter Bäume vorhanden, erreicht jedoch nie eine Konzentration von über 0.1 %.

3.2. VERAENDERUNG DES ALKALOIDMUSTERS WAEHREND DER BLATTENTWICKLUNG

Wie in der Einleitung erwähnt, wissen wir, dass sich im Verlauf der vegetativen Entwicklung von *C. liberica* der Gehalt der Methylxanthine und Methylharnsäuren verändert (Baumann et al., 1976). Dabei durchläuft die Pflanze für ihr Alter charakteristische Alkaloidmuster. Das Ergebnis dieser Untersuchung stammt aus einer Vielzahl von Analysen an Pflanzen verschiedenen Alters.

Um einen möglichen metabolischen Zusammenhang zwischen den Xanthinen und Harnsäuren, bzw. innerhalb der verschieden methylierten Harnsäuren besser erkennen zu können, war es nötig, die Musterentwicklung an einzelnen Blättern derselben Pflanze zu verfolgen. Für diese Untersuchung wurde eine *Liberica* Pflanze mit 12 Laubblattpaaren (LBP) ausgewählt. Jede Woche wurden von den obersten 3 LBP je 1 Blattprobe (Durchmesser 1.0 cm) ausgestanzt, getrocknet und bis zur Analyse mittels HPLC bei -16°C aufbewahrt. Die Reinigung der Extrakte erfolgte an einer Extrelutsäule. Im Verlauf weiterer 6 Wochen wurden auch die sich neu bildenden Blattpaare in die Untersuchungen einbezogen,

sodass insgesamt 6 LBP Blattproben entnommen wurden. Die Blätter wurden wie folgt mit Buchstaben bezeichnet:



In der nachfolgenden Tabelle sind Fläche und Alkaloidgehalt der einzelnen Blätter dargestellt. Der absolute Gehalt des ganzen Blattes wurde erhalten, indem der Gehalt einer Blattscheibe auf die ganze Blattfläche umgerechnet wurde.

Tab. 1: Blattfläche (cm²) und Alkaloidgehalt (µg) der obersten 3 bzw. 6 Blätter von *C. liberica* während 7 Wochen (vergl. Abb. 1)

		Blattfläche	Alkaloidgehalt (µg)			
			Thbr	Coff	TMHS	O(2)TriMHS
1. Woche	Blatt A	86 cm ²	-	-	1313	1313
	Blatt B	110 cm ²	-	-	840	2100
	Blatt C	33 cm ²	16	-	672	1806
2. Woche	Blatt A	90 cm ²	-	-	1375	1031
	Blatt B	118 cm ²	-	-	1052	2403
	Blatt C	106 cm ²	-	-	1349	3104

3. Woche	Blatt A	90 cm2	-	-	793	339
	Blatt B	118 cm2	-	-	700	1540
	Blatt C	127 cm2	-	-	1617	2748
	Blatt D	56 cm2	21	-	1212	3707
4. Woche	Blatt A	90 cm2	-	-	1515*	216
	Blatt B	118 cm2	-	-	817	1634
	Blatt C	131 cm2	-	-	1334	2835
	Blatt D	114 cm2	-	-	435	4935
5. Woche	Blatt A	90 cm2	-	-	-	-
	Blatt B	118 cm2	-	-	-	565
	Blatt C	131 cm2	-	-	1334	1167
	Blatt D	150 cm2	-	-	-	2100
	Blatt E	58 cm2	-	-	517	3323
6. Woche	Blatt A	90 cm2	-	-	-	-
	Blatt B	118 cm2	-	-	-	-
	Blatt C	131 cm2	-	-	-	-
	Blatt D	150 cm2	-	-	+	2673
	Blatt E	101 cm2	-	-	+	3600
	Blatt F	9 cm2	-	-	171	355
7. Woche	Blatt A	90 cm2	-	-	-	-
	Blatt B	118 cm2	-	-	-	-
	Blatt C	131 cm2	-	-	-	-
	Blatt D	150 cm2	-	-	-	572
	Blatt E	136 cm2	-	-	103	1212
	Blatt F	58 cm2	+	+	221	960

* bei diesem Wert handelt es sich wahrscheinlich um einen
Analysenfehler

+ weniger als 10 µg

Wie aus der Tabelle und der nachfolgenden Abbildung (Abb. 1) hervorgeht, ist beim Blatt A die TMHS das dominierende Alkaloid, während diese Rolle bereits im Blatt B von der O(2)TriMHS übernommen und bis zum Blatt F beibehalten wird. Die O(2)TMHS tritt in diesem Stadium noch nicht auf.

mg / Blatt

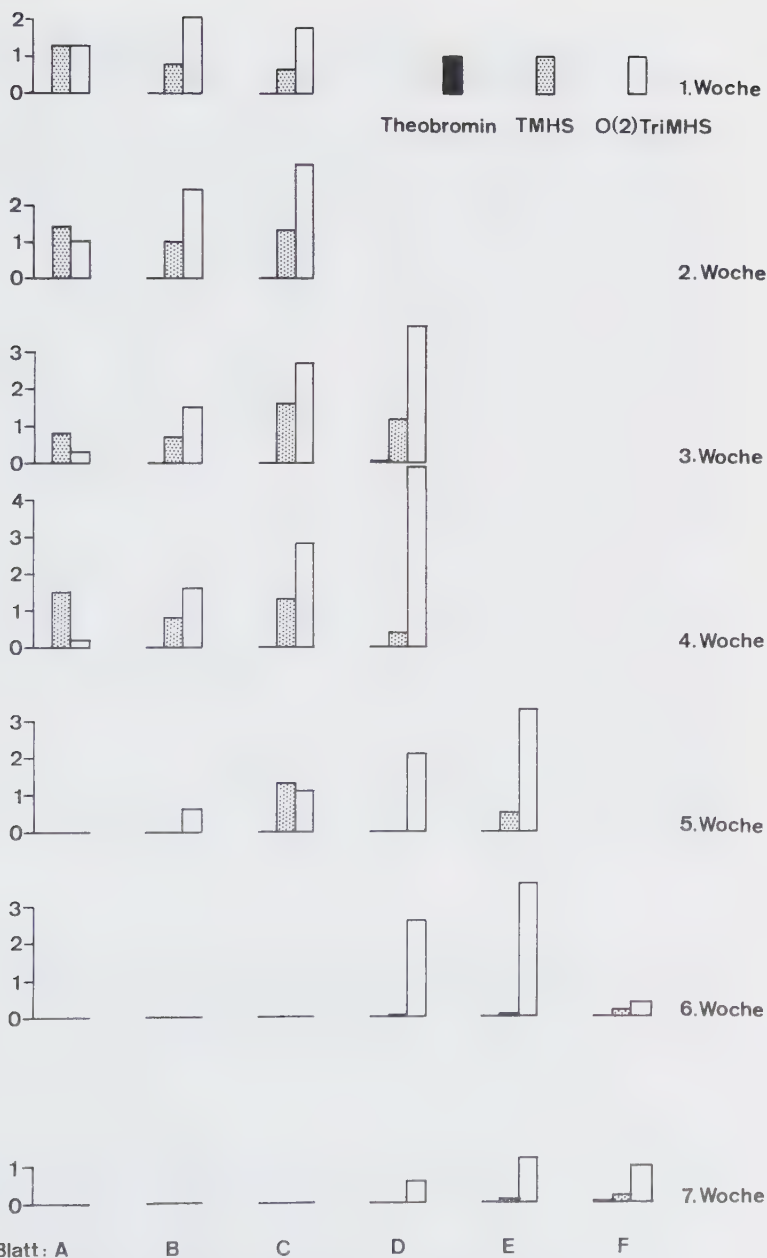


Abb. 1: Zeitlicher Verlauf des Alkaloidgehaltes (mg) der obersten 3 bzw. 6 Blätter von *C. liberica* während 7 Wochen (Werte siehe Tab. 1)

3.3. ANALYSE SEHR JUNGER BLÄTTER UND KNOSPEN VERSCHIEDEN ALTER PFLANZEN

Im Vordergrund dieses Versuches stand die Frage, ob jedes Laubblatt der grossblättrigen *Coffea* Arten ähnliche Alkaloidmuster wie die ganze Pflanze durchläuft, oder ob das Blatt bereits im Frühstadium seiner Entwicklung das für die ganze Pflanze charakteristische Alkaloid enthält. Um diese Frage abzuklären, wurden Knospen und junge Blätter verschieden alter Pflanzen untersucht.

Die Resultate der Analysen sind in der folgenden Tabelle (Tab. 2) und der besseren Uebersicht wegen in einer Grafik (Abb. 2) zusammengefasst. Die Aufstellung erfolgt in 2 Altersgruppen, entsprechend den beiden dominierenden Harnsäuren. Die erste Altersgruppe (unverzweigte Pflanzen) ist durch das Vorherrschen der TMHS charakterisiert, bei der zweiten Gruppe (verzweigte Pflanzen) wird diese Rolle von der O(2)TriMHS übernommen. Bei der Pflanzengruppe im TMHS-Stadium scheint das Muster des sich entwickelnden Blattes nicht so streng vom Hauptalkaloid der ganzen Pflanze geprägt zu sein. Aber auf Grund dieser Untersuchung ist während der Blattentwicklung keine Abfolge verschiedener Alkaloide zu erkennen.

Bei der Pflanzengruppe mit O(2)TriMHS als Hauptalkaloid enthält bereits die kleine Knospe praktisch ausschliesslich dieses Alkaloid.

Tab. 2: Alkaloidgehalt (μg) sehr junger Blätter und Knospen (K) verschiedener grossblättriger *Coffea* Arten
C. liberica: unverzweigte Pflanzen
C. excelsa und C. abeokutae: verzweigte Pflanzen
(vergl. Abb. 2)

Pflanze	TG (mg)	Alkaloidgehalt (μg)			
		Theobromin	Coffein	TMHS	O(2)TriMHS
C. liberica (K)	6.4	1.9	2.7	82.6	-
"	28.6	76.6	231.1	568.1	-
" (1)	32.4	-	-	49.4	43.6
"	54.7	60.5	14.2	1449.7	297.7

Pflanze	TG (mg)	Alkaloidgehalt (µg)			
		Theobromin	Coffein	TMHS	O(2)TriMHS
C. abeokutae (K)	4.5	-	-	-	20.0
C. excelsa (K)	13.7	5.2	4.3	9.3	274.8
" (K)	15.6	6.6	5.6	5.6	304.5
"	26.2	10.8	+	15.4	660.5
"	28.1	2.7	-	2.6	265.4
"	58.5	6.0	-	-	644.7
C. abeokutae	70.7	29.8	4.5	12.4	1381.8
C. excelsa	120.2	59.8	-	18.3	1972.3

+ weniger als 1 µg

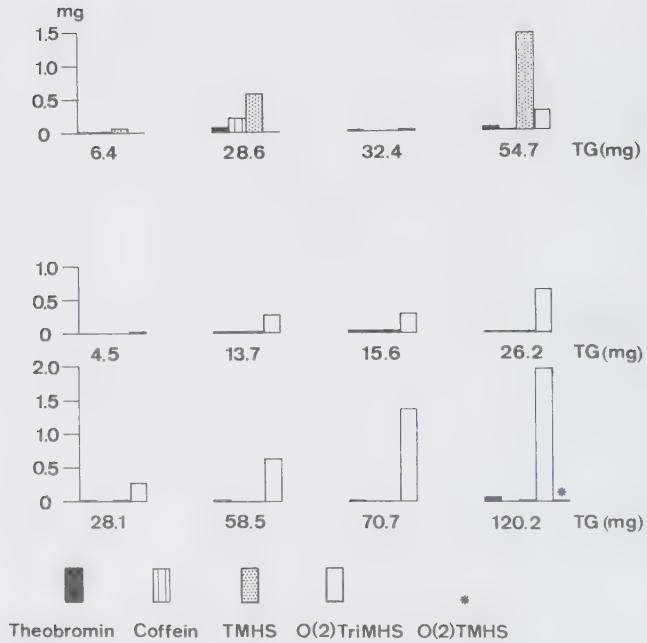


Abb. 2: Alkaloidgehalt (mg) sehr junger Blätter und Knospen verschiedener grossblättriger Coffea Arten
 Obere Reihe: unverzweigte Pflanzen
 Mittlere und untere Reihe: verzweigte Pflanzen
 (Werte siehe Tab. 2)

3.4. VERTEILUNG DES ALKALOIDGEHALTES UND DER METABOLISCHEN AKTIVITAET IM BLATT

Im Hinblick auf die Versuche zum Metabolismus der Purinalkaloide mit Blattscheiben, die jeweils aus dem jüngsten Blatt ausgestanzt werden, musste die Homogenität des Blattes in Bezug auf die Verteilung der Methylxanthine und der Methylharnsäuren untersucht werden. Dazu wurden an einer *Liberica* Pflanze (11 LBP), die sowohl TMHS als auch O(2)TriMHS enthielt, vom obersten LBP nach folgendem Plan Blattscheiben ausgestanzt, extrahiert ("Extrelut-Methode") und mit DC analysiert.

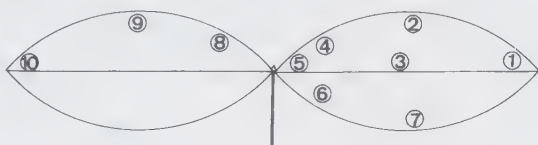


Abb. 3: Schema der Probenentnahme aus dem jüngsten Blattscheibenpaar von *C. liberica* (vergl. Tab. 3, 4; Abb. 4, 5)

Tab. 3: Alkaloidgehalt (μg) der Blattscheiben aus dem jüngsten Blattscheibenpaar von *C. liberica* (vergl. Abb. 4)

Alkaloid- gehalt (μg)	Probennummer									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Theobromin	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
O(2)TriMHS	17	18	13	10	8	14	22	15	23	28
TMHS	23	15	16	16	23	9	8	14	4	5
	+ weniger als 1 μg									

Die Ergebnisse sind in Abb. 4 graphisch dargestellt. Qualitativ ergeben sich keine Unterschiede im Alkaloidgehalt an verschiedenen Stellen des Blattes, auch variiert der Gesamtalkaloidgehalt nicht wesentlich, das mengenmässige Verhältnis der beiden Harnsäuren zueinander aber ziemlich stark. Es ist jedoch kein Gradient in Längs- oder Querrichtung des Blattes festzustellen.

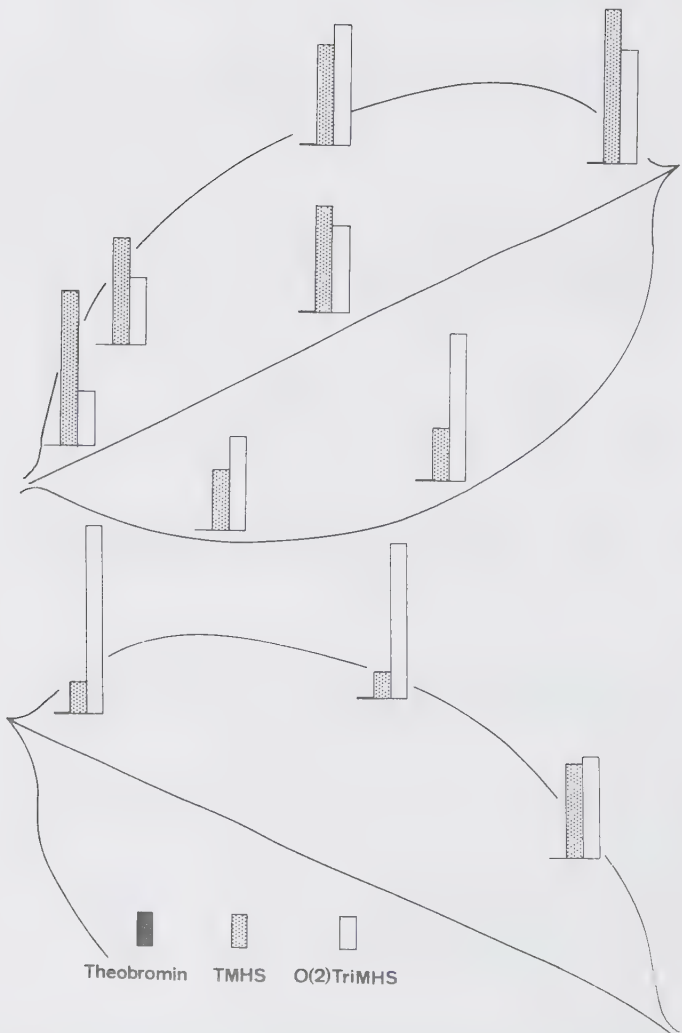


Abb. 4: Alkaloidgehalt der Blattscheiben aus dem jüngsten Blattpaar von *C. liberica* (Werte siehe Tab. 3)

Lokale Unterschiede im Metabolismus:

Im selben Experiment wurden die Blattscheiben unterschiedlicher Lokalisation mit ^{14}C -Theobromin infiltriert und nach 7 h auf die Verteilung der Radioaktivität hin untersucht. Die folgende Tabelle zeigt den prozentualen Anteil der Radioaktivität, die mit Chloroform von der Extrakt säule eluierbar ist, sowie deren Aufteilung auf die Methylxanthine und die Methylharnsäuren, bezogen auf die totale Aktivität der Blattscheiben (=100%)

Tab. 4: Prozentuale Verteilung der Radioaktivität nach Fütterung von ^{14}C -Theobromin an Blattscheiben aus dem jüngsten Blattpaar von *C. liberica* (vergl. Abb. 5)

	Probennummer									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CHCl ₃ -Phase	77	69	61	64	60	64	72	66	59	71
Theobromin	60	60	55	61	57	58	60	60	51	59
TMHS	11	5	3	1	2	3	8	3	5	7
Coffein	6	4	3	2	2	3	4	3	3	4

Wie aus Tab. 4 und Abb. 5 erkennbar ist, wurde überall weniger als die Hälfte des radioaktiven Theobromins umgesetzt, jedoch ist die Menge der durch den Metabolismus markierten Purinalkaloide Coffein und TMHS in der Blattspreitenspitze durchwegs grösser als in der Nähe der Spreitenbasis. Auch verschiebt sich das Verhältnis der markierten Substanzen gegen die Blattspitze hin zu Gunsten der TMHS, was allgemein auf einen beschleunigten Metabolismus zurückgeführt werden kann, denn aufgrund unserer Kenntnisse über die Coffeinbiosynthese ist anzunehmen, dass das Theobromin zuerst zu Coffein methyliert wird, bevor die zweite Methylierung und die Oxidation zu TMHS stattfindet. Radioaktive O(2)TriMHS konnte nicht festgestellt werden. Für Experimente mit Blatteilen ist es also wichtig, dass diese in der gleichen Entfernung von der Spreitenbasis entnommen werden, um Pflanzenmaterial ähnlicher metabolischer Aktivität zu erhalten.



Abb. 5: Verteilung der Radioaktivität nach Fütterung von ^{14}C -Theobromin an Blattscheiben aus dem jüngsten Laubblattpaar von *C. liberica* (Werte siehe Tab. 4)

3.5. 14C-COFFEIN-FUETTERUNGEN

3.5.1. FUETTERUNG AN MEHREREN PFLANZEN DER SPEZIES C. ABEOKUTAE

Es wurden zu diesem Experiment Pflanzen derselben Art mit 5 Laubblattpaaren gewählt, die aber aus Samenmaterial verschiedener Bäume herangezogen worden waren. Je eines der beiden jüngsten Blätter wurde samt einem kurzen Stielstück abgeschnitten und in die radioaktive Fütterungslösung gestellt. Nach einem Tag wurde die Tracerlösung durch Leitungswasser ersetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 7 Tagen wurden die Blätter extrahiert (Sep-Pak-Methode), analysiert, und die Verteilung der Radioaktivität wurde bestimmt. Aus der Darstellung der Resultate (Abb. 6) ist leicht ersichtlich, wie das vorhandene Alkaloidmuster (im oberen Balken dargestellt) den Metabolismus des gefütterten Coffeins (unterer Balken) beeinflusst.

Pflanze

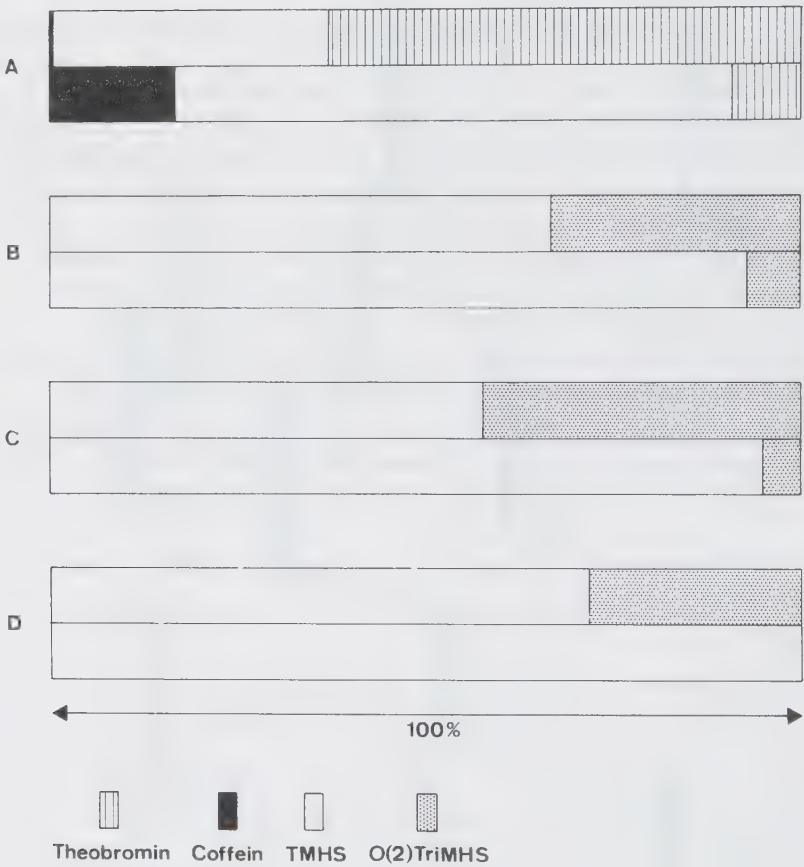


Abb. 6: Alkaloidgehalt und Radioaktivitätsverteilung nach Fütterung von ^{14}C -Coffein an verschiedenen Pflanzen der Spezies *C. abeokutae*
Oberer Balken: Prozentuale Verteilung der Alkaloide
Unterer Balken: Prozentuale Verteilung der Radioaktivität auf die Purinalkaloide

3.5.2. ZEITVERSUCHE

Fütterung an *C. excelsa*

An einer *Coffea excelsa* Pflanze mit 4 Astpaaren wurden die beiden äussersten Blattpaare der obersten Verzweigung mit ^{14}C -Coffein gefüttert. Im Zeitraum von 8 Tagen wurden die 4 Blätter geerntet und mit der MgO -Methode aufgearbeitet. Die Blätter enthielten:

O(2)TriMHS 0.16 % des TG

O(2)TMHS 0.007 % des TG

Die Radioaktivität, welche sich in der Chloroform-Phase befand, wurde zu jedem Zeitpunkt mit 100 % festgelegt und ist wie folgt auf die Purinalkaloide verteilt.

% Radioaktivität

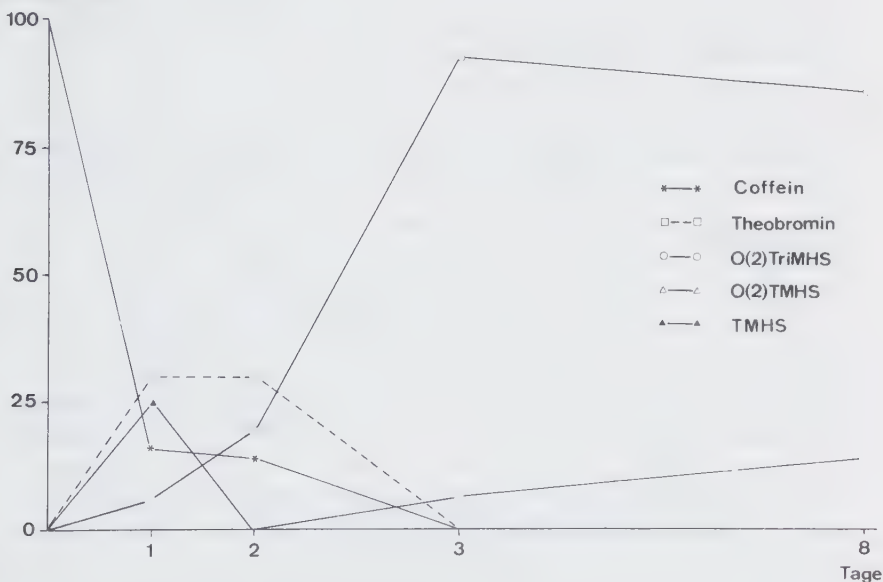


Abb. 7: Zeitlicher Verlauf der Radioaktivität nach Fütterung von ^{14}C -Coffein an den jüngsten 2 Blattpaaren der obersten Verzweigung von *C. excelsa*

Am 1. und 2. Tag nach der Fütterung treten mindestens zwei markierte Verbindungen auf, die zusammen 24 % bzw. 36 % der gesamten Radioaktivität ausmachen, aber nicht identifiziert wurden. Es handelt sich dabei vielleicht einerseits um Monomethylxanthine oder Monomethylharnsäuren andererseits um 8-Methoxycoffein (O(8)TMHS). Wie aus der Verteilung der Radioaktivität ersichtlich ist, wird das gefütterte Coffein zu TMHS, O(2)TriMHS und O(2)TMHS oxidiert oder durch Demethylierung in Theobromin überführt. Geringe Radioaktivität war auch in der Wasserphase zu messen.

Fütterung an *C. abeokutae*

Von einer Pflanze mit 6 LBP wurden aus einem der beiden jüngsten Blätter 5 Blattscheiben ausgestanzt und mit markiertem Coffein infiltriert. Die Blattscheiben wurden zwischen 3,5 und 46 h inkubiert und anschliessend analysiert (Ba(OH)₂-Methode). Sie enthielten im Durchschnitt

TMHS 0.16 %

O(2)TriMHS 0.13 %

Verteilung der Radioaktivität auf die verschiedenen Verbindungen nach DC-Separation:

%Radioaktivität

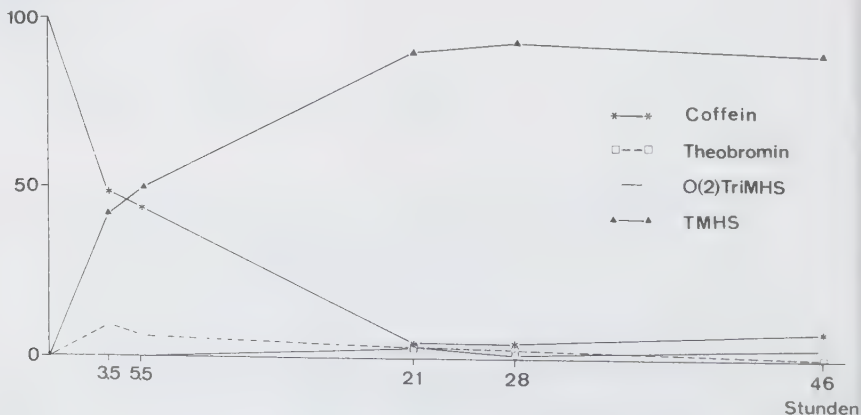


Abb. 8: Zeitlicher Verlauf der Radioaktivität nach Fütterung von ¹⁴C-Coffein an Blattscheiben des einen jüngsten Blattes einer unverzweigten *C. abeokutae* Pflanze

Im Experiment an einer Pflanze mit 7 LBP wurden die beiden jungen Blätter mit radioaktivem Coffein infiltriert. Puringehalt der Blätter (Sep-Pak-Methode):

TMHS 0.90 %

O(2)TriMHS 1.03 %

Trotz einer Inkubationszeit von 3 Wochen wurde nur die Hälfte des infiltrierten Coffeins umgesetzt. Offenbar wegen des grossen TMHS-Pools trat O(2)TriMHS nicht als Metabolit des Coffeins auf.

3.6. 14C-TMHS-FUETTERUNG

3.6.1. FUETTERUNG AN VERSCHIEDENEN PFLANZEN DER SPEZIES LIBERICA

An einer Gruppe 4 gleichaltriger *C. liberica* Pflanzen, kurz vor dem Verzweigen, wurde versucht, die Metaboliten der TMHS zu identifizieren. Pflanze A und D befanden sich in einem "Wachstumsschub"; die jüngsten Blätter waren noch hell und zart. Die entsprechenden Blätter der Pflanzen B und C waren bereits lederartig verhärtet. Die Aufbereitung der gefütterten Blattscheiben erfolgte nach der "Extrelut-Methode", die Analyse mittels DC. Das Ergebnis des Versuchs ist in den folgenden beiden Tabellen (Tab. 5 und Tab. 6) zusammengefasst:

Tab. 5: Blattmaterial und prozentualer Alkaloidgehalt (µg) der zur 14C-TMHS-Fütterung verwendeten *C. liberica* Pflanzen

Pflanze	Blattmaterial	Alkaloidgehalt	
		TMHS	O(2)TriMHS
A	jüngstes Blatt, zart	0.11	1.36
B	zweitjüngstes Bl., derb	-	0.64
C	jüngstes Blatt, derb	-	0.59
D	jüngstes Blatt, zart	2.10	-

Tab. 6: Inkubationszeit und prozentuale Verteilung der aus der Extrelut-Säule eluierbaren Radioaktivität nach ^{14}C -TMHS-Fütterung von Blattscheiben an unverzweigten *C. liberica* Pflanzen

Pflanze Inkubations- eluierbare

	Zeit	Aktivität	TMHS	O(2)TriMHS	O(2)TMHS
A	3.5 h	83	66	11	3
A	7 h	82	59	19	2
B	7 h	73	68	-	-
C	7 h	68	60	2	1
D	7 h	84	83	-	-

Bei allen 5 Proben tritt 1-3 % der Radioaktivität an der Front des LM2 auf. Es könnte sich um 8-Methoxiharnsäuren handeln. Bei Pflanze B und C ist zudem eine Zone zwischen O(2)TriMHS und TMHS (LM2) leicht radioaktiv.

3.6.2. PARALLEL - FUETTERUNG VON ^{14}C -COFFEIN UND ^{14}C -TMHS

Fütterung an einer jungen Pflanze

Das Experiment wurde mit Blattscheiben durchgeführt, die vom jüngsten LBP einer *C. liberica* Pflanze (2 LBP) stammten. Die Analyse (Ba(OH)₂-Methode) ergab folgenden Alkaloidgehalt:

- 0.20 % Coffein
- 0.01 % TMHS
- 0.02 % O(2)TriMHS

Die Inkubationszeit betrug 96 h. Wie auf Grund des relativ grossen Coffein-Pools zu erwarten war, wurde Coffein kaum umgesetzt. Es traten sehr geringe Radioaktivitäten an Theobromin und hydrophilen Substanzen auf.

TMHS wird schnell zu O(8)TMHS metabolisiert. Auch hier ist die hydrophile Fraktion leicht radioaktiv markiert.

Fütterung an einer Pflanze mit 6 LBP

Für die Fütterung wurden Blattscheiben vom jüngsten LBP einer *C. abeokutae* Pflanze verwendet. Der Gehalt an Purinalkaloiden betrug (Ba(OH)₂-Methode):

TMHS 0.60 %

O(2)TriMHS 0.03 %

Während der Inkubationszeit von 52 h wurde Coffein zu Theobromin, TMHS und zu weiteren, hydrophilen Substanzen metabolisiert.

TMHS wurde in derselben Zeit nicht umgesetzt.

Fütterung an einer verzweigten Pflanze

Für diesen Parallelversuch wurde eine *C. liberica* Pflanze mit zwei Verzweigungen verwendet. Die Blattscheiben des einen jüngsten Blattes wurden mit markiertem Coffein und die Blattscheiben des gegenüberliegenden Blattes mit markierter TMHS infiltriert. Die Extraktion erfolgte mit der Ba(OH)₂-Methode, die Auftrennung der Metaboliten mittels DC. Das verwendete Blattpaar enthielt lediglich O(2)TriMHS in einer Konzentration von 1 % des TG. Wie aus der grafischen Darstellung ersichtlich ist (Abb. 9), wird Coffein zu Theobromin demethyliert und wahrscheinlich dieses in hydrophilere Substanzen überführt, welche mit den verwendeten chromatographischen Systemen nicht aufgetrennt wurden, sondern am "Start" sitzen blieben.

% Radioaktivität

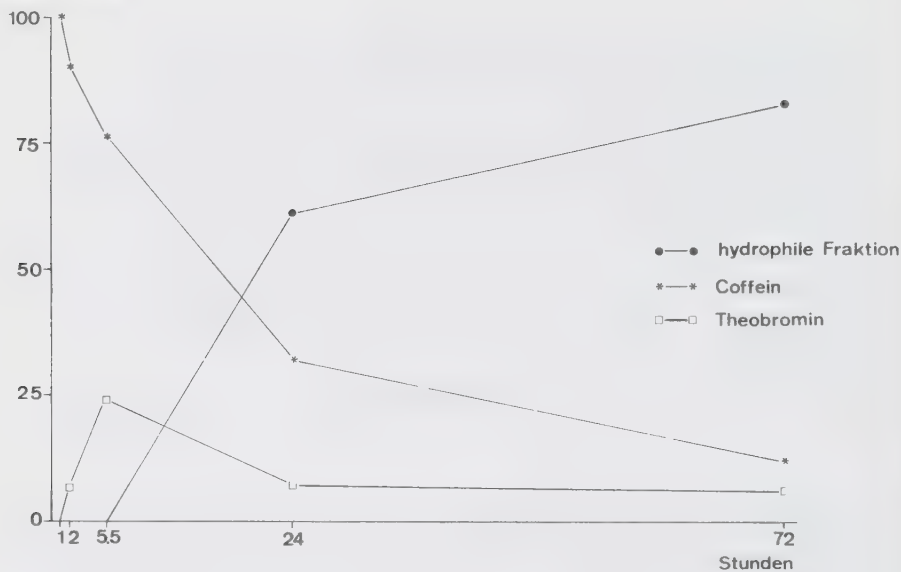


Abb. 9: Zeitlicher Verlauf der Radioaktivität nach Fütterung der Blattscheiben des jüngsten Blattes von *C. liberica* mit ^{14}C -Coffein (Parallelexperiment zu ^{14}C -TMHS-Fütterung, Abb. 10)

% Radioaktivität

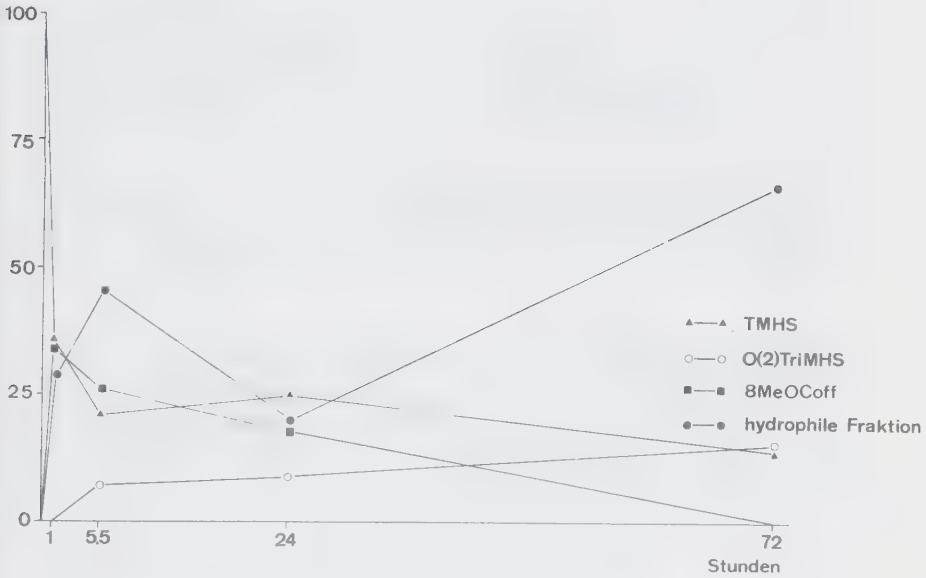


Abb. 10: Zeitlicher Verlauf der Radioaktivität nach Fütterung der Blattscheiben des jüngsten Blattes von *C. liberica* mit ^{14}C -TMHS (Parallelexperiment zu ^{14}C -Coffein-Fütterung, Abb. 9)

TMHS wird einerseits zu O(8)TMHS sowie O(2)TriMHS, andererseits ebenfalls zu hydrophilen Verbindungen metabolisiert.

3.7. 14C-THEOBROMIN-FUETTERUNG

3.7.1. FUETTERUNG AN C. LIBERICA

In diesem Versuch wurde an 4 gleichaltrigen (kurz vor dem Verzweigen) Pflanzen untersucht, wie konstant der Theobrominumsatz bei verschiedenen Individuen von *C. liberica* ist. Wie aber schon die Analyse ("Extrelut-Methode") der Blattscheiben zeigt, ist der physiologische Zustand der Blätter ziemlich unterschiedlich. Die Pflanzen A und B befanden sich in einem "Wachstumsschub", während die Pflanzen C und D zur Zeit des Experimentes kein starkes Wachstum aufwiesen. Die Inkubationszeit betrug 7 Stunden. Die mit Chloroform aus der Extrelut-Säule eluierbare Aktivität betrug bei den verschiedenen Pflanzen:

A 84 %

B 84 %

C 85 %

D 74 %

Für die folgende Darstellung wurde diese Aktivität 100 % gesetzt, um sie besser mit den unter gleichen Bedingungen eluierbaren Alkaloiden vergleichen zu können.

Pflanze

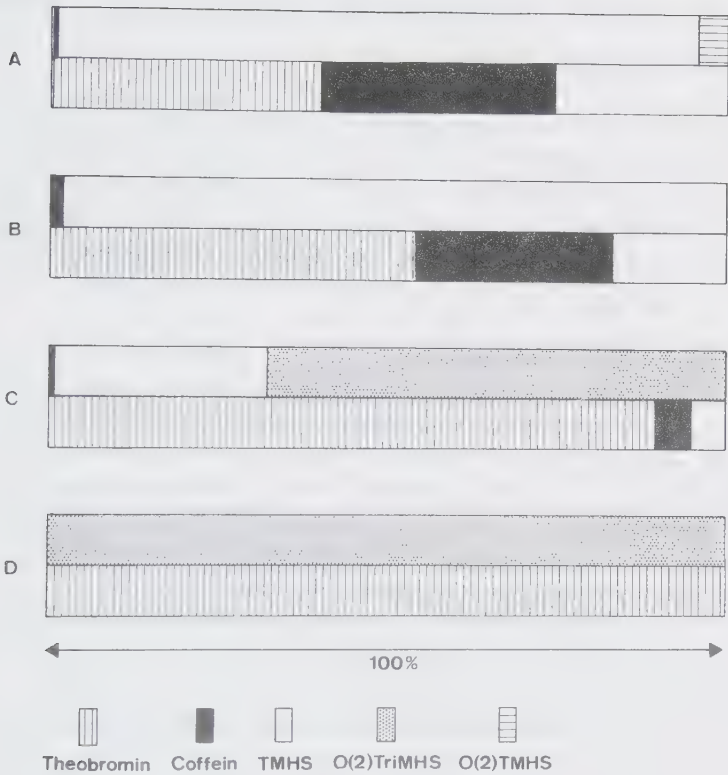


Abb. 11: Alkaloidgehalt und Radioaktivitätsverteilung nach Fütterung von ^{14}C -Theobromin an verschiedenen Individuen von *C. liberica*
Oberer Balken: Prozentuale Verteilung der Purinalkaloide
Unterer Balken: Prozentuale Verteilung der Radioaktivität

Pflanzen, die Coffein, aber noch keine O(2)TriMHS enthalten, vermögen Theobromin rasch zu Coffein und TMHS umzusetzen.

3.7.2. PARALLEL-FÜETTERUNG VON 14C-THEOBROMIN UND 14C-COFFEIN

Fütterung an einer Keimpflanze

Das Experiment wurde an den Kotyledonen einer *C. liberica* Pflanze durchgeführt. Die je 4 Blattscheiben wurden zwischen 3 h und 31 h inkubiert, anschliessend nach der Ba(OH)₂-Methode aufbereitet und mit DC analysiert. Die beiden Keimblätter wiesen einen stark unterschiedlichen Alkaloidgehalt auf:

	Keimblatt Theobromin-Experiment	Keimblatt Coffein-Experiment
Theobromin	0.31 %	0.04 %
Coffein	0.90 %	1.90 %

Theobromin wurde nur in Spuren zu Coffein methyliert, während Coffein überhaupt nicht umgesetzt wurde.

Fütterung an einer verzweigten Pflanze

Die verwendete *C. abeokutae* Pflanze wies erst ein Astpaar auf. Es wurden Blattscheiben des jüngsten Laubblattpaares der Hauptachse mit markiertem Theobromin bzw. Coffein infiltrierte. Die Proben wurden nach der Ba(OH)₂-Methode aufbereitet und die Extrakte mit DC aufgetrennt. Der durchschnittliche Gehalt des verwendeten Pflanzenmaterials an Alkaloiden war:

TMHS 0.10 %

O(2)TrimHS 0.60 %

Die Radioaktivitätsverteilung zeigte während der Inkubationszeit von 72 h folgenden Verlauf (Abb. 12, Abb. 13). Die jeweils extrahierbare Radioaktivität wurde 100 % gesetzt. Als hydrophile Fraktion wird diejenige Radioaktivität bezeichnet, die mit den verwendeten Laufmitteln (LM1, LM2) am Start liegen blieb.

%Radioaktivität

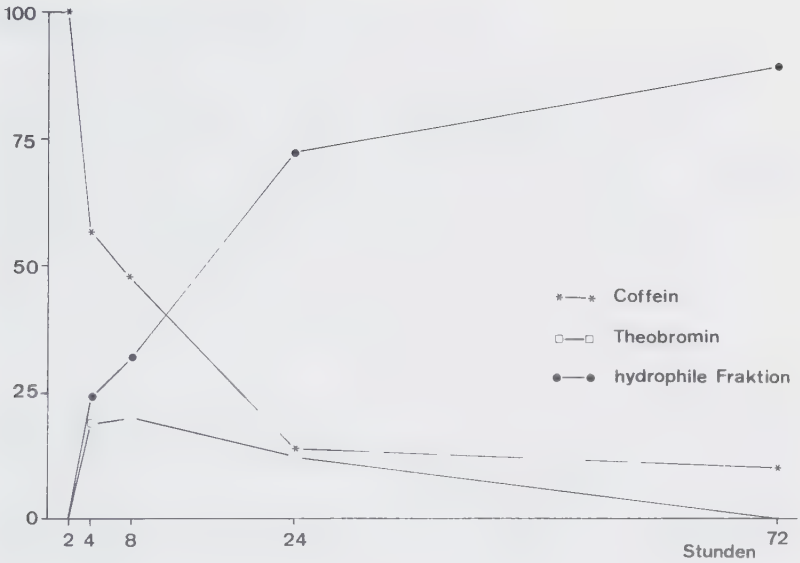


Abb. 12: Zeitlicher Verlauf der Radioaktivität nach Fütterung von ^{14}C -Coffein an Blattscheiben des jüngsten Blattpaares einer verzweigten *C. abeokutae* Pflanze (Parallelfütterung von Theobromin, Abb. 13)

% Radioaktivität

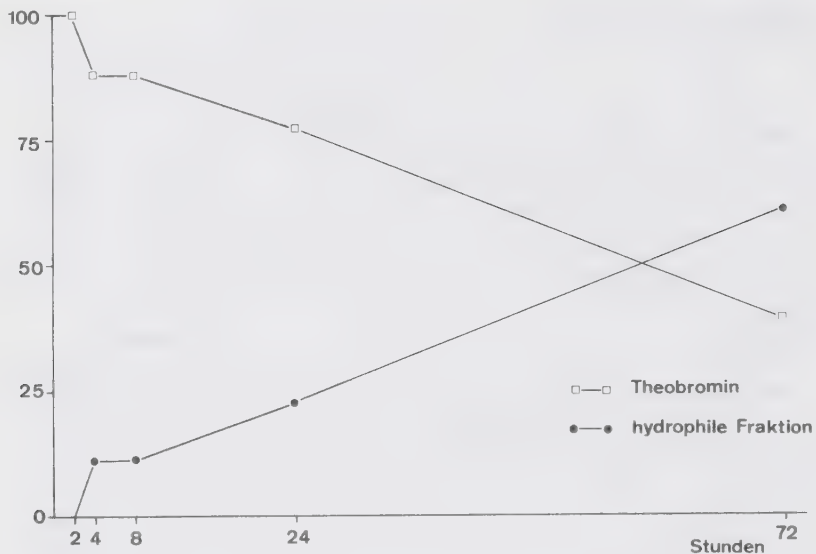


Abb. 13: Zeitlicher Verlauf der Radioaktivität nach Fütterung von ^{14}C -Theobromin an Blattscheiben des jüngsten Blattpaares einer verzweigten *C. abeokutae* Pflanze (Parallelfütterung von Coffein in Abb. 12)

Wie aus den beiden graphischen Darstellungen leicht ersichtlich ist, wird Coffein zu Theobromin demethyliert. Dieses wird weiter zu polaren Substanzen metabolisiert.

3.8. 14C-O(2)TRIMHS-FUETTERUNG

Da die ringmarkierte 14C-O(2)TriMHS über die käufliche 2-14C-Harnsäure sehr schlecht zugänglich ist, wurde in einem Experiment diejenige radioaktiv markierte O(2)TriMHS eingesetzt, welche im 1. Versuch unter 3.5.2. von der Pflanze synthetisiert wurde. In einem anderen Experiment wurde die chemisch synthetisierte, methylmarkierte 14C-O(2)TriMHS verwendet.

3.8.1. FUETTERUNG RINGMARKIERTER, BIOSYNTHETISCHER 14C-O(2)TRIMHS

Die biosynthetische 2-14C-O(2)TriMHS (Kapitel 3.5.2.) wurde - zusammen mit der phytoenen, inaktiven O(2)TriMHS - isoliert und mit DC gereinigt. Die so gewonnene 2-14C-TriMHS besass die äusserst geringe spezifische Radioaktivität von 20 dpm/ μ g. Der Tracer wurde in Blattscheiben aus einem der beiden jüngsten Laubblätter einer Pflanze mit 7 Laubblattpaaren (*C. abeokutae*) infiltriert. Die Analyse vor dem Experiment ("Extrelut-Methode") ergab folgenden durchschnittlichen Alkaloidgehalt:

TMHS	974 μ g/BS	1.16 %
O(2)TriMHS	39.6 μ g/BS	0.46 %

Durch die Infiltration des Tracers wurde der O(2)TriMHS-Pool jeder Blattscheibe um zusätzliche 12.6 μ g vergrössert, sodass der O(2)TriMHS-Gehalt während des Experiments pro Blattscheibe durchschnittlich 51.2 μ g (0.61%) betrug.

Die Inkubationszeiten lagen zwischen 1/2 h und 30 h. Es konnte aber zu keiner Zeit ein radioaktiver Metabolit nachgewiesen werden.

3.8.2. FUETTERUNG METHYLMARKIERTER 14C-O(2)TRIMHS

Für dieses Experiment wurde eine Pflanze der Spezies *C. liberica* mit 8 Laubblattpaaren verwendet. Es wurden Blattscheiben aus dem einen jüngsten Blatt mit Tracer infiltriert. Die Blattanalyse ("Extrelut-Methode") ergab einen Alkaloidgehalt von 1.72 % an TMHS. Die Inkubationszeiten lagen zwischen 1 h und 48 h. Die mit Chloroform aus der Extrelutsäule eluierbare Radioaktivität nahm kontinuierlich von 92 % (1 h Inkubationszeit) auf 30 % (48 h

Inkubationszeit) ab. Sie bestand ausschliesslich aus der infiltrierten O(2)TrimHS. Radioaktiv markierte Metaboliten blieben offenbar in der wässrigen Phase zurück.

4. DISKUSSION

4.1. DAS ALKALOIDMUSTER

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen chemischen Muster und deren Abhängigkeit vom Entwicklungszustand der Pflanze entsprechen grundsätzlich den Verhältnissen, wie sie von Baumann et al. (1976) beschrieben wurden. Allerdings konnten mit der damals verwendeten Extraktionsmethode nur ca 20 % des Theobromins erfasst werden. So enthält zumindest der Keimling neben Coffein immer Spuren von Theobromin. Im Laufe meiner Untersuchungen fand ich einzelne Pflanzen, die anstelle der erwarteten Methylharnsäuren Theobromin und Coffein enthielten, jedoch auch durch eine veränderte Entwicklung auffielen: Verzögerung des Wachstums, Ausbildung von Blättern, die bereits im Jugendstadium eine derbe Beschaffenheit zeigten und zum Teil deformiert waren. Es kann nicht entschieden werden, ob der Grund für diese Abweichungen bei endogenen (chemische Rassen) oder exogenen (z. B. Licht, Temperatur) Faktoren liegt.

In der normal entwickelten Pflanze wird, sobald einige Blattpaare vorhanden sind, im einzelnen Blatt Coffein zu TMHS umgesetzt, wie die in Kapitel 3.5.2. beschriebenen Tracerversuche an Pflanzen mit 6 (Abb. 8) beziehungsweise 7 Laubblattpaaren zeigen. Obwohl hier die betreffenden Blattpaare kein endogenes Coffein mehr enthielten, läuft unzweifelhaft eine solche Umwandlung auch im noch coffeinhaltigen Blatt ab, was einerseits aus dem Musterablauf (Coffein ---> Coffein/TMHS ---> TMHS), andererseits aus den Resultaten des Versuchs unter 3.5.1. hervorgeht.

Es stellte sich nun die Frage, ob auch später, wenn die Pflanze durch die Präsenz von Methylharnsäuren charakterisiert wird, im Einzelblatt sowohl eine Bildung von Coffein als auch dessen Umsetzung in Methylharnsäuren stattfindet. Mit anderen Worten, ob in der frühen Ontogenese des Blattes jedesmal wieder die für die Individualpflanze typischen Alkaloid-Stadien durchlaufen werden. Das Ergebnis der entsprechenden Untersuchungen an unverzweigten Pflanzen und mehrjährigen Bäumen (Kapitel 3.2. und 3.3.) zeigt eindeutig, dass sich die Abfolge des Musters während der Entwicklung jedes Blattes nicht wiederholt. Vielmehr enthält

bereits die Blattnospe dieselbe Methylharnsäure wie junge Blätter mit völlig expandierter Spreite. Damit steht fest, dass in diesen grossblättrigen Kaffeearten die Coffeinbildung relativ früh abnimmt (Versuche unter 3.7.1. und 3.7.2), beziehungsweise aufhört und erst wieder im Zuge der Samenentwicklung aufgenommen wird (Citroreksoko, 1979). Zum andern wird aber auch deutlich, dass im einzelnen Blatt nur der zum gleichen Zeitpunkt in der ganzen Pflanze ablaufende Uebergang vom einen zum andern Alkaloid beobachtet werden kann, wie z. B. von der TMHS zur O(2)TriMHS (Kapitel 3.2.).

4.2. METABOLISMUS DER GEFUETTERTEN TRACER

Bei der Interpretation der Ergebnisse von Fütterungsversuchen darf nicht vergessen werden, dass jedes Experiment das biologische System beeinflusst und möglicherweise die Kompartimentierung verändert.

Zudem besteht die Gefahr, dass der applizierte Tracer nicht oder nur teilweise zum endogenen Pool gelangt, was zu Resultatverfälschungen führt. Es konnte an Blattscheiben von *C. arabica* gezeigt werden, dass sich die Auswaschkinetik des infiltrierten nicht von derjenigen des phytogenen Coffeins unterscheidet, was auf gleiche Lokalisation hinweist (Pfrunder, 1981). Da die in Betracht gezogenen Methylharnsäuren ähnliche Löslichkeitseigenschaften wie das Coffein besitzen, ist anzunehmen, dass sie ebenfalls rasch zum endogenen Pool gelangen.

Das Einführen von zellfremden Substanzen in die Pflanze bedeutet zwar eine weitere Veränderung des biologischen Systems, stellt aber - falls die Substanzmenge klein und die spezifische Aktivität hoch ist - einen empfindlichen Test auf eventuell vorhandene Enzymaktivitäten dar. Davon wurde in diesen Tracerexperimenten verschiedentlich Gebrauch gemacht, um festzustellen, zu welchem Zeitpunkt bestimmte Umsetzungen von der Pflanze nicht mehr durchgeführt werden.

Da ausser in Versuch unter 3.8.1. die spezifische Aktivität des infiltrierten Tracers hoch war, können die Poolvergrösserung und die damit verbundenen Auswirkungen vernachlässigt werden. Bevor die Metaboliten der einzelnen Tracer bersprochen werden,

sei ein Hinweis auf die öfters durchgeführten Parallelversuche gestattet. Füttert man einer Pflanze das markierte Ausgangsprodukt einer ganzen Reaktionskette, so ist der Tracer bereits beim 2. oder 3. Reaktionsschritt so stark verdünnt, dass die Reaktion kaum mehr verfolgt werden kann. Darum wurden in Parallelfütterungen gleichzeitig zwei Tracer infiltriert, von denen vermutet wurde, dass sie in der Reaktionskette nahe beieinander liegen. Sie wurden in verschiedenem, aber physiologisch möglichst gleichwertigem Blattmaterial (z. B. gegenständige Blätter) appliziert. Auf diese Weise können auch Zweifel über die Reihenfolge der Metaboliten beseitigt werden.

Metaboliten des Theobromins

Der Metabolismus des Theobromins wurde an drei unterschiedlichen Stadien der pflanzlichen Entwicklung studiert: Keimling, unverzweigte und verzweigte Pflanze. Es ist vorwegzunehmen, dass Theobromin in allen drei Stadien anders metabolisiert wird. In den coffein- und theobrominhaltigen Kotyledonen des Keimlings (Stadium 1) wurde ^{14}C -Theobromin, wenn auch nur in kleinen Mengen, zu Coffein methyliert (Versuch unter 3.7.2.). Es ist deshalb anzunehmen, dass wie in *C. arabica* auch in grossblättrigen *Coffea* Arten Theobromin der Vorläufer des Coffeins ist.

In den Versuchen unter 3.4. und 3.7.1. wurden 5 unverzweigte Pflanzen (Stadium 2) gefüttert. Zwei enthielten nur TMHS, zwei daneben auch $\text{O}(2)\text{TriMHS}$ in grösseren Konzentrationen; eine Pflanze enthielt nur noch $\text{O}(2)\text{TriMHS}$. In den ersten 4 Pflanzen wurde das infiltrierte Theobromin zu Coffein und TMHS metabolisiert. Die " $\text{O}(2)\text{TriMHS}$ -Pflanze" setzte den angebotenen Tracer weder zu Coffein, noch zu TMHS um. Rund $1/4$ der Radioaktivität befand sich jeweils in der Wasserphase. Auch die verzweigte " $\text{O}(2)\text{TriMHS}$ -Pflanze" (Stadium 3) setzte Theobromin weder zu Coffein, noch zu einer der fraglichen Methylharnsäuren um, hingegen nahm die Radioaktivität der Wasserphase während der gesamten Dauer des Experimentes von 3 Tagen kontinuierlich zu (Versuch unter 3.7.2., Abb. 13).

Metaboliten des Coffeins

Auch der Metabolismus des Coffeins ist stark vom jeweiligen Entwicklungsstadium abhängig.

Beim ersten untersuchten Stadium handelte es sich um zwei Pflanzen mit Coffein als Hauptalkaloid: Die eine Pflanze (Keimpflanze mit Kotyledonen) enthielt daneben auch Theobromin, die andere (mit zwei Laubblattpaaren) Spuren von TMHS und O(2)TriMHS im jüngsten Laubblattpaar. Die Keimpflanze setzte 14C-Coffein nicht um (1. Versuch unter 3.7.2.), während bei der etwas älteren Pflanze Spuren von Radioaktivität im Theobromin und in der Wasserphase zu finden waren (1. Versuch unter 3.6.2.).

Die 6 Pflanzen des zweiten untersuchten Stadiums waren unverzweigt und besaßen 5 bzw. 6 Laubblattpaare, die TMHS als Hauptalkaloid aufwiesen, ausgenommen eine Pflanze die neben TMHS eine noch grössere Menge an Theobromin enthielt. Hauptprodukt war fast durchwegs TMHS. Nur in einem Fall fand eine Demethylierung zu Theobromin statt. Schwache Radioaktivität war sonst in Theobromin und O(2)TriMHS zu finden (Kapitel 3.5.1., Abb. 6 und 2. Versuch in Kapitel 3.5.2., Abb. 8).

Die Pflanzen des dritten Stadiums enthielten alle O(2)TriMHS als Hauptalkaloid. Die beiden Pflanzen mit einer Verzweigung, beziehungsweise mit zwei Verzweigungen demethylierten Coffein zu Theobromin, welches offenbar weiter zu Substanzen metabolisiert wurde, die bei der Extraktion in der Wasserphase blieben (2. Versuch unter 3.7.2., Abb. 12 und 3. Versuch unter 3.6.2., Abb. 9). Die dritte zu diesem Stadium untersuchte Pflanze (mit 4 Verzweigungen) setzte Coffein zusätzlich zu TMHS, O(2)TriMHS und O(2)TMHS um (1. Versuch unter 3.5.2. Abb. 7). Die Radioaktivität der Wasserphase konnte aber keiner der folgenden Substanzen zugeordnet werden: Trigonellin, Allantoin, Allantoinsäure und Harnsäure. Weiter ist aufgrund des Radioaktivitätsverlaufes anzunehmen, dass die TMHS als Vorstufe zur Synthese der O(2)TriMHS und/oder der O(2)TMHS verwendet wurde.

Metaboliten der TMHS

An insgesamt 7 Pflanzen verschiedener Altersstufen wurde TMHS gefüttert. Hier gelang es aber nicht, die metabolische Aktivität einzelnen, chemisch charakterisierten Altersstufen zuzuordnen.

Als sichere Reaktionsprodukte der TMHS müssen die beiden Methoxiharnsäuren O(2)TriMHS und O(2)TMHS betrachtet werden (Kapitel 3.6.1. und 3. Versuch unter 3.6.2.), wobei aber nicht klar ist, ob die TMHS der direkte Vorläufer beider Methoxiharnsäuren ist.

Obwohl für meine Arbeit nicht alle wünschbaren Referenzsubstanzen zur Verfügung standen, (z. B. 8-Methoxitheophyllin) kann das 8-Methoxicoffein höchst wahrscheinlich als weiterer Metabolit der TMHS angesehen werden (1. und 3. Versuch unter 3.6.2., Abb. 10). Diese Verbindung konnte jedoch noch nie aus einem Coffea Blatt isoliert werden. Es muss deshalb, und weil die betreffenden Gewebe, wenn überhaupt, nur noch Spuren von TMHS aufwiesen, angenommen werden, dass hier eine unspezifische Umlagerung einer Methylgruppe stattgefunden hat.

Metaboliten der O(2)TriMHS

Die ringmarkierte O(2)TriMHS wurde einer Pflanze appliziert, die TMHS und O(2)TriMHS enthielt. Sie setzte den Tracer nicht um (Kapitel 3.8.1.).

Die ^{14}C -O(2)TriMHS, die den radioaktiven Kohlenstoff an der Methoxylgruppe trägt, wurde einer ausschliesslich O(2)TriMHS-haltigen Pflanze infiltriert. Während der Inkubationszeit von zwei Tagen konnte ebenfalls kein radioaktiver Metabolit aus der Chloroformphase isoliert werden, hingegen stieg die Radioaktivität der Wasserphase kontinuierlich an. Es ist wahrscheinlich, dass die markierte Methylgruppe abgespalten und dem C1-Pool zugeführt wurde (Kapitel 3.8.2.).

Die Tracerversuche lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Theobromin kann zu Coffein methyliert oder in Substanzen der Wasserphase überführt werden.
- Coffein wird zu Theobromin demethyliert oder in TMHS überführt
- TMHS wird zu den beiden Methoxiharnsäuren O(2)TriMHS und O(2)TMHS metabolisiert.

Die Umsetzungen sind weitgehend spezifisch für ein bestimmtes Entwicklungsstadium.

4.3. DIE BEDEUTUNG DER METHYLHARNSÄUREN FÜR DIE PFLANZE

Die Methylharnsäuren und die Methylxanthine sind sich nicht nur in ihrer chemischen Natur, sondern auch in ihrem Vorkommen in der Pflanze sehr ähnlich: Beide Alkaloidgruppen treten in vergleichbaren Konzentrationen im Blatt auf (Coffein bei *Coffea arabica*, Theobromin bei *Theobroma cacao*, O(2)TriMHS bei *Coffea liberica*), und beide werden im alternden Blatt abgebaut. Zudem steht aufgrund der vorliegenden Arbeit fest, dass sowohl zwischen den Methylharnsäuren und den Methylxanthinen (Coffein und Theobromin), als auch innerhalb der verschiedenen Methylharnsäuren, wie sie in grossblättrigen *Coffea* Arten vorkommen, ein enger metabolischer Zusammenhang besteht. Allerdings muss noch abgeklärt werden, ob beim Abbau der Methylharnsäuren dieselben stickstoffhaltigen Verbindungen entstehen wie beim Coffeinabbau in *C. arabica*, der ja bereits von Kalberer (1964) untersucht wurde.

Aus den eben geschilderten Gründen kann die Bedeutung dieser Methylharnsäuren nicht isoliert von derjenigen des Coffeins, bzw. des Theobromins betrachtet werden. Die in der Einleitung diskutierten möglichen Rollen des Coffeins im Stoffwechsel der stickstoffhaltigen Verbindungen müssen grundsätzlich auch für die Methylharnsäuren in Betracht gezogen werden. Aufgrund der Vermutung, dass der Harnsäureabbau analog dem Coffeinabbau vor sich geht, scheint auch bei den Methylharnsäuren die Aufgabe der Stickstoffreserve für synthetische Aufgaben der Pflanzen im Vordergrund zu stehen. Diese Ansicht wird bestärkt durch die Entdeckung, dass TMHS als alleiniges Purinalkaloid in den Samen des Wildkakaos *Theobroma grandiflorum* Schum. vorkommt (Vasconcelos 1975, Baumann und Wanner 1980). Ein endgültiger Beweis dieser Theorie sollte mit Abbauprobeversuchen, in welchen stickstoffmarkierte Purinalkaloide eingesetzt werden, möglich sein.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In den Blättern verschiedener *Coffea* Arten, die alle unter den Sammelbegriff "Liberio-excelsoide" fallen, wurde die in der Natur bisher noch nie beobachtete O(2),1,7,9-Tetramethylharnsäure entdeckt. Ihr Vorkommen ist auf junge Blätter verzweigter Pflanzen beschränkt und übertrifft nie die Konzentration von 0.1 % TG.

Es wurde der Metabolismus der Purinalkaloide in den Blättern dieser Pflanzen studiert. Gleichzeitig wurde das jeweilige Muster an solchen Verbindungen, sowie der Entwicklungszustand der Pflanzen und der untersuchten Blätter festgehalten. Es sind die folgenden radioaktiven Verbindungen synthetisiert und appliziert worden: 2-¹⁴C-Theobromin, 2-¹⁴C-Coffein, 2-¹⁴C-TMHS und 2-Methoxyl-¹⁴C-O(2)TriMHS.

Die während der vegetativen Entwicklung beobachteten metabolischen Schritte sind jeweils nur während einer begrenzten Zeit quantitativ bedeutsam, charakterisieren aber zusammen mit dem Alkaloidmuster das jeweilige Pflanzenalter:

Die Methylierung von Theobromin zu Coffein findet ausschliesslich bei der sehr jungen Pflanze statt, die erst wenige Laubblattpaare aufweist, in welchen Theobromin Begleitalkaloid von Coffein ist. Die ältere Pflanze metabolisiert Theobromin zu polaren, nicht identifizierten Verbindungen.

Der metabolische Uebergang Coffein → TMHS findet in der jungen Pflanze vor und während dem Stadium der ersten Verzweigung bevorzugt statt. Diese Pflanzen sind durch einen hohen Gehalt an TMHS charakterisiert.

Im eigentlichen Verzweigungsstadium ist die O(2)TriMHS Hauptalkaloid. Coffein wird jetzt einerseits zu Theobromin demethyliert, welches seinerseits weiter metabolisiert wird, andererseits ist eine Umsetzung über TMHS zu O(2)TriMHS möglich. Aus TMHS werden O(2)TriMHS und spurenweise auch O(2)TMHS gebildet.

DANK

Ganz besonders danke ich Herrn PD Dr. T.W. Baumann für die Beratung bei der Ausführung der Experimente und die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Prof. Dr. H. Wanner möchte ich danken für sein stetes Interesse am Entstehen dieser Arbeit, Herrn Prof. Dr. M. Hesse und Herrn Guggisberg (beide org. chem. Institut der Universität Zürich) für die Aufnahme des Massenspektrums und die Durchführung der Pyrolyse und der Schmelzpunktbestimmung. Ich danke Fräulein Eveline Dertle für die Mithilfe bei der Synthese der Tracer.

Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung und der Stiftung für wissenschaftliche Forschung an der Universität Zürich unterstützt.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ALBANESE, M., Arch. exp. Path. u. Pharmakol., 25, 449 (1895)
(zitiert von Myers, 1928)

ARNAUD, M.J.: Metabolism of 1,3,7-Trimethyldihydrouric Acid in the Rat: New Metabolic Pathway of Caffeine. Experientia 32, 1238-1240 (1976)

ARNAUD, M.J.: Identification, Kinetic and Quantitative Study of (2-¹⁴C) and (1-Me-¹⁴C)Caffeine Metabolites in Rat's Urine by Chromatographic Separations. Biochemical Medicine 16, 67-76 (1976)

ARNAUD, M.J., and WELCH, CH.: Metabolic Pathway of Theobromine in the Rat and Identification of Two New Metabolites in Human Urine. J. Agric. Food Chem., 27(3), 524-527 (1979)

BAUMANN, T.W., DECHSLIN, M. and WANNER, H.: Coffein und methylierte Harnsäuren: Chemische Muster während der vegetativen Entwicklung von Coffea liberica. Biochem. Physiol. Pflanzen 170, 217-225 (1976)

BAUMANN, T.W. und WANNER, H.: The 1,3,7,9-Tetramethyluric Acid Content of Cupu (Theobroma Grandiflorum Schum.). Acta Amazonica 10(2), 425 (1980)

BENEDICT, S.R., J. Lab. and Clin. Med., 2, 1 (1916) (zitiert von Myers, 1928)

BILTZ, H. und BUELOW, H.: Abkömmlinge der 7,9-Dimethylharnsäure. Ann. Chem. 423, 159-177 (1921)

BILTZ, H. und MAX, F.: Methylierungen mit Diazo-methan in der Harnsäure-Reihe. Ber. Dtsch. chem. Ges. 53, 2327-2341 (1920)

BILTZ, H. und PARDON, H.: Ueber die Acetylierung der Harnsäuren. J. prakt. Chem. 134, 310-334 (1932)

BODZYNSKI, S. und GOTTILIEB, R., Arch. exp. Path. u. Pharmacol., 26, 45, (1895); 37, 385, (1896); Ber. chem. Ges. 32, 1113, (1895) (zitiert von Myers, 1928)

CHARRIER, A. et BERTHAUD, J.: Variation de la teneur en caféine dans le genre Coffea. Café, Cacao, Thé 19(4) 251-264 (1975)

CITROREKSOKO, P.S.: Distribution and Metabolism of Purine Alkaloids in the Developing Fruits of the Liberio-excelsoid Group of Coffea. Juris, Zürich 1979

CITROREKSOKO, P.S., PETERMANN, J., WANNER, H., and BAUMANN, T.W.: Synthesis of 2-14C-tetramethyluric Acids. J. Lab. Cps. 17, 775-778 (1980)

FINK, K. and ADAMS, W.S.: Paperchromatographic Data for Purines, Pyrimidines and Derivatives in a Variety of Solvents. J. Chromat. 22, 118-129 (1966)

FISCHER, E.: Ueber die Harnsäure. II. Ber. Dtsch. chem. Ges. 17, 1776-1788 (1884)

FISCHER, E. und ACH, L.: Synthese des Caffeins. Ber. Dtsch. chem. Ges. 28, 3135-3143 (1895)

FISCHER, E.: Synthese des Theobromins. Ber. Dtsch. chem. Ges. 30, 1839-1845 (1897)

FRISCHKNECHT, P.M. and BAUMANN, T.W.: Synthesis of 2-14C Theobromine. J. Lab. Cps. 16(5), 669-672 (1979)

HAGBORG, W.A.F.: A Device for Injecting Solutions and Suspensions into Thin Leaves of Plants. Can. J. Bot. 48, 1135-1136 (1970)

HEFTMANN, E.: Synthesis of Caffeine-2-14C. J. Lab. Cps. 7, 463-465 (1971)

JOHNSON, T.B.: Purines in the Plant Kingdom: The Discovery of a New Purine in Tea. J. Amer. Chem. Soc. 59, 1261-1264 (1937)

KALBERER, P.: Untersuchungen zum Abbau des Kaffeins in den Blättern von *Coffea arabica*. Ber. Schweiz. Bot. Ges. 74, 62-107 (1964)

KOSSEL, A.: Ueber eine neue Base aus dem Pflanzenreich. Ber. Dtsch. chem. Ges. 21, 2164-2167 (1888)

LEHMANN, C.G., Lehrbuch der physiologischen Chemie, Leipzig, zweite Auflage, 2, 367 (1850) (zitiert von Myers, 1928)

MOTHES, K. und ENGELBRECHT, L.: Ueber Allantoinsäure und Allantoin. I. Ihre Rolle als Wanderform des Stickstoffs und ihre Beziehung zum Eiweisstoffwechsel des Ahorns. Flora 139, 586-616 (1952)

MOTHES, K.: Chemische Muster und Entwicklung in der Pflanzenwelt. Die Naturwissenschaften 52, 571-585 (1965)

MOTHES, K.: Zur Problematik der metabolischen Exkretion bei Pflanzen. Die Naturwissenschaften 53, 317-323 (1966)

MYERS, V.C. und WARDELL, E.L.: The Influence of the Ingestion of Methylxanthines on the Excretion of Uric Acid. J. Biol. Chem. 77, 697-721 (1928)

PETERMANN, J., BAUMANN, T.W. and WANNER, H.: A New Tetramethyluric Acid from *Coffea Liberica* and *C. Dewevrei*. Phytochemistry 16, 620-621 (1977)

PFRUNDER, R., WANNER, H., FRISCHKNECHT, P.M. and BAUMANN, T.W.: An Attempt to Localize Caffeine in the Cell by its Washout Kinetics. In: 9th International Scientific Colloquium on Coffee, ASIC, London, 16-20 June 1980 (1980, im Druck)

REINBOTHE, H.: Zur Frage der Biosynthese von Allantoin und Allantoinsäure in höheren Pflanzen. III. Purinabbau in Ureidpflanzen. Flora 151, 315-328 (1961)

RUNGE, Phytochemische Entdeckungen, Berlin, 1820; zitiert von McCrudden, F.H., Uric Acid, New York (1905) (zitiert von Myers, 1928)

STAHL, E.: Dünnschichtchromatographie. Springer, Berlin, 527 (1967)

THOMAS, R.J., FELLER, U. and ERISMANN, K.H.: Ureide Metabolism in Non-nodulated Phaseolus vulgaris L. J. Exp. Bot. 31, 409-417 (1980)

VASCONCELOS, M.N., LEAD DA SILVA, M., SOARES MAIA, J.G., GOTTLIEB, O.R.: Estudo químico das sementes do Copuacu. Acta Amazonica 5(3), 293-295 (1975)

WANNER, H., PESAKOVA, M., BAUMANN, T.W., CHARUBALA, R., GUGGISBERG, A., HESSE, M. and SCHMID, H.: O(2),1,9-Trimethyluric Acid and 1,3,7,9-Tetramethyluric Acid in Leaves of Different Coffea Species. Phytochemistry 14, 747-750 (1975)

WEEVERS, T.: Die Funktion der Xanthinderivate im Pflanzenstoffwechsel. Arch. neerl. Sci. 3 B 5, 111-195 (1930)

WERNER, E.A.: The Constitution of Carbamides. Part. IX. The Interaction of Nitrous Acid and Mono-substituted Ureas. The Preparation of Diazomethan, Diazoethan, Diazo-n-butane and Diazoisopenthan from the Respective Nitrosoureas. J. chem. Soc. London, 115, 1098 (1919)

WOSKRESENSKY, A.: Ueber das Theobromin. Ann. Pharm. 41, 125-127 (1842)

CURRICULUM VITAE

von Josef Bruno Petermann, geboren am 12. 5. 1951 in Root LU,
Bürger von Root LU

1958-1964 Primarschule in Root LU und Hergiswil NW
1964-1967 Gymnasium Kantonsschule Stans
1967-1972 Gymnasium Kantonsschule Schwyz
Maturitätsabschluss Typus B
1972 Immatrikulation an der Philosophischen Fakultät II der
Universität Zürich
1977 Diplom für Naturwissenschaften
1977-1981 Doktorarbeit unter der Leitung von Herrn PD Dr. T.W.
Baumann und Herrn Prof. Dr. H. Wanner am Institut
für Pflanzenbiologie
Seit 1979 Assistent am selben Institut

Während meines Studiums besuchte ich bei folgenden Dozenten
Vorlesungen, Kurse und Praktika:

Anthropologie und Physiologie des Menschen	Prof. J. Biegert, Prof. R. Hunsperger, Prof. S. Kubik, Dr. W. Scheffrahn
Biochemie	Prof. P. Christen, Prof. R. Humbel, Prof. J. Kägi
Chemie	PD E. Dubler, Prof. C.H. Eugster, Prof. H.R. Oswald, Dr. P. Rüedi, Prof Ch. Schlatter
Mathematik	Prof. E. Batschelet
Zoologie	Prof. H. Burla, Prof. P.S. Chen, PD A. Dübendorfer, PD E. Jungen, Dr. H. Jungen, Prof. H. Kummer, Dr. G. Mindek, Prof. R. Nöhtiger, Prof. H. Rieber, Prof. P. Tardent, Prof. R. Wehner, Prof. V. Ziswiler
Botanik	Prof. R. Bachofen, PD T.W. Baumann, Prof. C.D. Cook, Dr. W. Egger, PD B.M. Eller, Prof. P.K. Endress, Prof. H.R. Hohl, Prof. C.U. Kramer, Prof. D. Rast, Prof. O. Rohweder, Dr. F. Schanz, Prof. H. Schäppi, Prof. J. Schlittler, Prof. E. Thomas, Prof. H. Wanner
Didaktik und Lehrübungen	Dr. R. Staub, Prof. O. Woodtli

